

Université de Sherbrooke

Imagerie moléculaire de la MMP-2

par
Réjean Lebel
Département de médecine nucléaire et radiobiologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.) en Sciences des radiations et imagerie biomédicale

Sherbrooke, Québec, Canada
Avril 2012

Membres du jury d'évaluation
Martin Lepage Ph.D., Dép. de médecine nucléaire et radiobiologie
Brigitte Guérin Ph.D., Dép. de médecine nucléaire et radiobiologie
Yves Bérubé-Lauzière Ph.D., Dép. de génie électrique et génie informatique
Yves St-Pierre Ph.D., Centre INRS–Institut Armand-Frappier

© Réjean Lebel, 2012



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-93247-6

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-93247-6

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Imagerie moléculaire de la MMP-2

par

Réjean Lebel

Département de médecine nucléaire et radiobiologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.) en Sciences des radiations et imagerie biomédicale, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Les métalloprotéinases de matrice (MMPs) sont des enzymes impliquées dans la restructuration tissulaire et la migration cellulaire. La MMP-2, en particulier, a été reconnue comme biomarqueur de la progression ou du pronostic de plusieurs pathologies, comme l'arthrite, l'athérosclérose, l'infarctus et le cancer. Son rôle exact est mal caractérisé. Pour ces raisons, il est important de développer des outils pour nous permettre d'étudier la MMP-2 de manière spécifique et non invasive.

Actuellement, il existe une grande quantité de sondes optiques (imagerie optique), d'agent de contrastes (imagerie par résonance magnétique) et de radiotraceurs (tomographie d'émission par positrons et tomographie d'émission monophotonique) ciblant les MMPs. Par contre, aucune de ces molécules ne permet de quantifier spécifiquement l'activité MMP-2, particulièrement envers la MMP-9 qui possède des substrats similaires. De plus, la plupart des études publiées sur le sujet sont incomplètes.

Cette thèse résume nos progrès dans le développement de molécules permettant de cibler spécifiquement et d'effectuer l'imagerie de la MMP-2. Toutes les molécules testées sont activées rapidement par la MMP-2 et se révèlent sélectives *in vitro* par rapport aux MMP-3, MMP-7 et MMP-9. Tout d'abord, un agent de contraste (PCA2-switch) est évalué dans un modèle de tumeur sous-cutanée chez la souris et nous permet de différencier entre des tumeurs possédant des niveaux d'activité faible ou élevé de la MMP-2. Nous explorons ensuite une série de sondes fluorescentes activables, dont l'une permet l'obtention de résultats prometteurs *in vitro* (haut rendement de l'atténuation et haute spécificité d'activation par la MMP-2 par rapport à la MMP-9). Toutefois, cette sonde ne se révèle pas spécifique *in vivo* – plutôt, toutes les sondes testées résultent en l'obtention d'une distribution similaire à la distribution d'une molécule contrôle (non spécifique).

L'une des principales limitations du domaine de l'imagerie des MMPs est le manque de contrôle pour différencier la captation et l'activation spécifique de la captation non spécifique des molécules testées. La dernière section de cette thèse inclut une étude de captation tumorale dans un modèle de tumeur sous-cutanée et de radiothérapie. Cette étude met en évidence l'implication de la captation non spécifique dans le signal observé en imagerie.

Mots clés : Métalloprotéinase de matrice, imagerie optique, imagerie par résonance magnétique, agent de contraste activable, sonde fluorescente activable

Molecular imaging of MMP-2

by

Réjean Lebel

Département de médecine nucléaire et radiobiologie

This thesis submitted at the Faculté de médecine et des sciences de la santé in partial fulfilment of the requirements for the degree of *Philosophiae Doctor* (Ph.D.) in Sciences des radiations et imagerie biomédicale

Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke,
Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

MMPs (matrix metalloproteinases) are enzymes involved in tissue architecture remodelling and cell migration. MMP-2, particularly, was found to be a biomarker of the progression or prognosis of several pathologies, such as arthritis, atherosclerosis, infarct and cancer. Yet, its exact role in these pathologies is still uncertain. For these reasons, it is critical to develop new tools to enable the specific and non invasive study of MMP-2.

As of now, a large number of optical probes (optical imaging), contrast agents (magnetic resonance imaging) and radiotracers (positron emission tomography, single photon emission tomography) have been published in the literature. However, none of the molecules allows for the specific quantification of MMP-2, particularly against MMP-9 which cleaves similar substrates.

This thesis describes our progress in the development of new molecules capable of targeting and allowing the imaging of MMP-2. All tested molecules were found to be quickly activated by MMP-2 and to be selective when compared with MMP3, MMP-7 and MMP-9. First, a contrast agent named PCA2-switch is tested in a mouse subcutaneous tumor model, and allows us to differentiate between tumors with low or high levels of MMP-2 activity. We also developed a panel of activatable fluorescent probes, one of which was found to be highly specific to MMP-2 (low activation by MMP-9, efficient quenching). However, an extensive set of control experiments does not enable to conclude on the specificity of the probes *in vivo*.

One of the principal limitations of many studies in the field of MMP imaging is the lack of proper controls, including unspecific uptake controls. The last section of this thesis discusses the impact of the EPR (enhanced permeability and retention) effect on the uptake of a non-specific probe in a subcutaneous tumor model treated with radiotherapy. Proper control experiments that should be performed when testing new MMP-2 probes are discussed.

Keywords: Matrix metalloproteinases, optical imaging, magnetic resonance imaging, activatable contrast agent, activatable fluorescence probe, enhanced permeability and retention (EPR).

Je dédie cette thèse à ma conjointe, Isabelle Brochu,
Pour son support indéfectible,
Sa compréhension,
Son amour.

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES SIGLES, ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES.....	XI
CHAPITRE 1. INTRODUCTION.....	1
1.1 LES MÉTALLOPROTÉINASES DE MATRICE.....	3
1.1.1 Description générale des MMPs.....	3
1.1.2 Découverte et caractérisation moléculaire de la MMP-2.....	4
1.1.3 Structure et domaines de la MMP-2.....	5
1.1.4 Expression, production et régulation de la MMP-2.....	7
1.1.5 Rôles physiologiques et pathologiques de la MMP-2.....	10
1.1.6 Détection expérimentale de la MMP-2.....	17
1.2 L'IMAGERIE MOLÉCULAIRE ET LES MODALITÉS D'IMAGERIE.....	19
1.2.1 Comportement des sondes in vivo.....	19
1.2.2 Les modalités d'imagerie TEP, TEM et TDM.....	21
1.2.3 L'imagerie par résonance magnétique.....	23
1.2.4 L'imagerie optique.....	26
1.3 L'IMAGERIE DES MMPS.....	33
1.3.1 Radiotraceurs pour la TEP et la TEM.....	38
1.3.2 Agents de contraste pour l'IRM.....	54
1.3.3 Sondes optiques pour l'IO.....	60
1.4 CONTEXTE ET ÉNONCÉ DE THÈSE.....	79
CHAPITRE 2. RÉSULTATS ET INTRODUCTION AUX TRAVAUX PUBLIÉS.....	82
2.1 DÉVELOPPEMENT ET ÉVALUATION DE MOLÉCULES AVEC COMMUTATEUR DE SOLUBILITÉ.....	83
2.2 PCA2-SWITCH – CRITIQUE ET JUSTIFICATION DE LA RÉORIENTATION DU PROJET VERS L'OPTIQUE.....	87
2.3 DÉVELOPPEMENT DE SONDAS FLUORESCENTES ACTIVABLES SPÉCIFIQUES À LA MMP-2.....	88
2.4 DÉTECTION DE LA MMP-2 PAR IMAGERIE OPTIQUE AVEC UNE SONDE FLUORESCENTE ACTIVABLE.....	93
2.4.1 Planification et vue d'ensemble des résultats.....	93
2.4.2 Normalisation et correction des données.....	98
2.4.3 Comparaison des analyses classiques et de l'analyse avec normalisation pour la dose effective et la captation.....	99

2.4.4	<i>Dissection des animaux post imagerie</i>	102
2.5	VARIATION DE LA CAPTATION DANS UN MODÈLE DE RADIOTHÉRAPIE	107
CHAPITRE 3. A NOVEL SOLUBILITY-SWITCHABLE MRI AGENT ALLOWS THE NON-INVASIVE DETECTION OF MATRIX METALLOPROTEINASE-2 ACTIVITY <i>IN VIVO</i> IN A MOUSE MODEL		108
CHAPITRE 4. IMPACT OF H-AGGREGATION ON ACTIVATABLE MMP-2 SPECIFIC PROBES FOR OPTICAL IMAGING		134
CHAPITRE 5. MRI AND OPTICAL IMAGING MONITORING OF TUMOR RESPONSE TO RADIOTHERAPY		159
CHAPITRE 6. DISCUSSION		183
6.1	LES CONTRÔLES EN IMAGERIE	184
6.1.1	<i>Contrôle de la captation non spécifique avec une molécule inerte mais non apparentée</i>	184
6.1.2	<i>Contrôle de la perfusion avec une molécule inerte et apparentée</i>	185
6.1.3	<i>Contrôle de compétition ou d'inhibition</i>	186
6.1.4	<i>Contrôle à l'aide d'une lignée cellulaire avec un niveau d'expression de la cible nul ou faible</i>	188
6.1.5	<i>Évaluation de sonde dans des modèles de pathologie <i>in vivo</i> et comparaison avec des cohortes saines</i>	189
6.2	OPTIMISATION DU DESIGN ET L'ÉVALUATION DE NOUVELLES SONDÉS SPÉCIFIQUES À LA MMP-2 <i>IN VIVO</i>	190
6.2.1	<i>Utilisation d'animaux MMP-2^{-/-} (KO)</i>	191
6.2.3	<i>Optimisation de la captation et la rétention de la sonde</i>	192
6.2.3	<i>Utilisation d'inhibiteurs spécifiques comme contrôle négatif</i>	194
6.2.4	<i>Les corrélations des résultats d'imagerie et d'immunohistochimie</i>	195
6.2.5	<i>Comparaison entre MMPs <i>in vitro</i> : quantification des sites actifs</i>	195
CHAPITRE 7. CONCLUSION		197
REMERCIEMENTS		201
Liste des références		202
ANNEXES		214
ANNEXE I. LE FLUOROPHORE CY5 : STRUCTURE ET DESCRIPTION		215
ANNEXE II. UN REGARD CRITIQUE SUR L'AGENT DE CONTRASTE P947		218
ANNEXE III. LES SONDÉS MMPSENSE 680 ET 750 FAST		221
ANNEXE IV. COMPARATIF MMPSENSE, PROSENSE ET ANGIOSENSE		224
ANNEXE V : ÉVALUATION DU COEFFICIENT DE PARTITION DES SONDÉS AVEC COMMUTATEUR DE SOLUBILITÉ		229
ANNEXE VI : UTILISATION DU LECTEUR DE PLAQUE TECAN M1000		232

ANNEXE VII : PROTOCOLE D'ÉVALUATION DE L'ACTIVATION DES SONDÉS FLUORESCENTES.....	235
ANNEXE VIII : IMAGERIE OPTIQUE DE SONDÉS FLUORESCENTES AVEC LE QOS	238
ANNEXE IX : IRM ET ÉVALUATION DES AGENTS DE CONTRASTE IN VIVO	242
ANNEXE X : ANALYSE DES IMAGES DES SONDÉS FLUORESCENTES IN VIVO	244
ANNEXE XI : UTILISATION DU MODÈLE DIFFUSION-PERFUSION (DPMODEL) SUR LES NŒUDS DE CALCUL ET COMPARAISON AVEC LE MODÈLE TOFTS : OBTENTION DES CARTES DE K^{TRANS} ET v_e ET RECRÉATION DES CARTES DE CONCENTRATION.	249
ANNEXE XII : OPÉRATION DE LA FONCTION VIEWER.M POUR L'OBTENTION DE CARTES DE CONCENTRATION AVEC LE MODÈLE DE RÉGION DE RÉFÉRENCE	260

Liste des tableaux

Tableau 1. Imagerie TEP et TEM des MMPs	35
Tableau 2. Imagerie optique des MMPs.....	36
Tableau 3. Imagerie par résonance magnétique des MMPs	37
Tableau 4. Planification des essais <i>in vivo</i> des sondes <i>I</i> , <i>II</i> et <i>III</i> et de leurs contrôles négatifs (<i>Is</i> , <i>IId</i> , <i>IIId</i>) et positif (<i>V</i>).....	93
Tableau 5. Signal et taux d'élimination post-injection de P945 et P1135.....	220
Tableau 6. Propriétés des sondes MMPsense.....	222
Tableau 7. Signal post-injection de 3 sondes "sense" de Perkin Elmer	225
Tableau 8. Signal spécifique post-injection des 3 sondes "sense" de Perkin Elmer	226

Liste des figures

Figure 1. Structure de la MMP-2.....	6
Figure 2. Régulation des MMPs.....	8
Figure 3. Exemple de progression tumorale.....	16
Figure 4. Principaux spectres de coefficients d'absorption <i>in vivo</i>	27
Figure 5. Fluorescence et agrégation H.....	30
Figure 6. Photoblanchiment.....	31
Figure 7. [¹¹ C]FMAME : Structure et résultats <i>in vivo</i>	39
Figure 8. Structure de [¹⁸ F]SAV03 et autoradiographie.....	40
Figure 9. Structure de [¹²³ I]CGS 27023 et imagerie TEM.....	41
Figure 10. Structure et biodistribution de [¹⁸ F]CGS 27023.....	42
Figure 11. Dérivés biphenylsulphamides : Structure et imagerie scintigraphique.....	43
Figure 12. Structure de [¹¹¹ In]-RP782 et autoradiographie.....	46
Figure 13. Structure de [^{99m} Tc]-RP805 et imagerie TEM/TDM.....	48
Figure 14. Anticorps anti-MMP-14 marqué au [¹²³ I] – Principe et imagerie TEM/TDM.....	51
Figure 15. Structure de Marimastat-ArB[¹⁸ F ₃] et imagerie TEP.....	53
Figure 16. Structures de PCA7-switch, PCA7-scrambled et PCA7-B.....	55
Figure 17. Principe de l'agent de contraste P947.....	56
Figure 18. Anticorps-PAMAM-[Gd]DTPA : Principe et résultats <i>in vivo</i>	59
Figure 19. Structure de FITC-GPLGVRGK-poly-Lys et imagerie optique.....	61
Figure 20. Structure de PB-1 et résultats <i>in vivo</i>	62
Figure 21. Structure de PB-2.....	63
Figure 22. Structure de Cy5.5-GVPLSLTMGC-NIRQ820.....	64
Figure 23. ([Cy5.5]-GGPRQITAGK) _n -poly-Lys.....	65
Figure 24. Quantum Dots avec CPP.....	67
Figure 25. [Cy5.5]-GPLGMRGLGK-BHQ3.....	67
Figure 26. Principe de l'ACPP Suc-e ₈ -PLGLAG-r ₉ -(Cy5).....	69
Figure 27. Nanotubes d'or fonctionnalisés au Cy5.5.....	71
Figure 28. Sonde TF-M-ApoB-GFP.....	72
Figure 29. Sonde GST- GPLGPRS -TM-DsRed2.....	75
Figure 30. Structure des molécules avec commutateur de solubilité.....	84
Figure 31. Évaluation du coefficient de partition octanol/eau des composés à commutateur de solubilité.....	85
Figure 32. Affinité cellulaire des composés à commutateur de solubilité.....	86
Figure 33. Spectres d'émission de l'AMC, FITC, Cy5 et Cy7 comparés à l'absorption du QSY21.....	89
Figure 34. Structures des composés bi-fluorescents.....	90
Figure 35. Signal lors de l'activation avec les sondes bi-fluorescentes.....	90
Figure 36. Évaluation des sondes I, II et III et de leurs contrôles <i>in vivo</i>	94
Figure 37. Diminution du signal de I entre les séances d'imagerie.....	95
Figure 38. Cinétique de I et de V <i>in vivo</i>	97
Figure 39. Normalisation de la cinétique de la sonde I dans la tumeur WT.....	98
Figure 40. « Analyse classique » de l'intensité des sondes I, II et III dans les tumeurs 45 et 90 minutes post-injection, et correction de perfusion.....	100

Figure 41. Intensité normalisée et corrigée pour la perfusion des sondes <i>I</i> , <i>II</i> et <i>III</i> dans les tumeurs WT (+++), KD (+) et les tissus de référence	102
Figure 42. Biodistribution post-injection de <i>I</i> , <i>II</i> , <i>III</i> et <i>V</i>	103
Figure 43. Vérification de la pénétration du signal	104
Figure 44. Accumulation des sondes en périphérie des tumeurs.....	105
Figure 45. Dissection : Fluorescence des tumeurs et normalisation avec les images en champ clair	106
Figure 46. Dissection : Comparaison des tumeurs post-injection de <i>I</i> et de <i>V</i>	106
Figure 47. Schéma de génération du contraste entre un tissu d'intérêt et une région de référence	190
Figure 48. Structure du Cy5	216
Figure 49. P947 vs P1135.....	219
Figure 50. Spectres d'absorbance et de fluorescence des sondes MMPsense.....	222
Figure 51. Structure de la sonde MMPsense 750	223
Figure 52. Comparaison de 3 sondes "Sense" de Perkin Elmer <i>in vivo</i>	225
Figure 53. Normalisation du signal des sondes Prosense et MMPsense	227
Figure 54. Imagerie optique avec le QOS	241
Figure 55. Comparaison des modèles diffusion-perfusion et Tofts pour l'évaluation de K^{Trans} et de v_e	259

Liste des sigles, abréviations et symboles

Ab	Anticorps (Antibody)
ACPP	CPP activable (Activable Cell Penetration Peptide)
AI	Analogue d'inhibiteur
AMC	amino-méthyl-coumarine (un fluorophore)
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BHQ3	Black Hole Quencher 3 (un groupement atténuateur)
CdS	Commutateur de solubilité (Différentiel de solubilité)
CPP	Peptide signal de pénétration cellulaire (Cell penetration peptide)
DOTA	acide 1,4,7,10-tetraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique (un chélateur)
DTPA	acide diéthylènetriaminopentaacétique (un chélateur)
EPR	Perméabilité et rétention augmentée (Enhanced Permeability and Retention)
Fi	Fibronectine
FITC	isothiocyanate de fluorescéine (Fluorescein isothiocyanate)
HPX	Hémopexine
IC ₅₀	Concentration pour obtenir 50% d'inhibition d'une réaction
IO (IOF)	Imagerie optique (de fluorescence)
IRM	Imagerie par résonance magnétique
k_{cat}	Constante catalytique d'une réaction enzymatique – vitesse de dégradation du substrat en situation de saturation de l'enzyme
K_i	Constante d'inhibition. En absence de substrat/ligand, le K_i indique la concentration d'inhibiteur à laquelle 50% des sites sont occupés.
K_M	Constante de Michaelis-Menten. Dans une réaction enzymatique, le K_M est la concentration du substrat résultant en la moitié de la vitesse maximale de production du produit
KD	Knockdown, répression de la production d'une protéine
KO	Knock-out, élimination de l'expression d'un gène
LogP	Coefficient de partition (pour cette thèse, il s'agit du coefficient octanol/eau)
MMP	Métalloprotéinase de matrice (Matrix metalloproteinase)
PAMAM	poly(amidoamine) (un polymère)

PB	Proteolytic beacon
PCA	Proteinase-modulated Contrast Agent
PKM	Pharmacokinetic modifier (Groupement moléculaire de nature inconnu mais dont le rôle est d'octroyer aux molécules sur lesquelles il est greffé la capacité de jouir de l'effet EPR.
Poly-X	Chaîne répétitive de l'acide aminé (X) indiqué
QD	Point quantique (Quantum Dot)
QOS	Quidd Optical Scanner
RR	Région de référence
SPECT	Tomographie d'émission monophotonique (Single photon emission CT)
TEP	Tomographie d'émission par positrons
TIMP	Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases (Tissue inhibitor of MMPs)
TMR	Tétraméthylrhodamine (un fluorophore)
TOI	Tissue of interest (Tissu d'intérêt)
Uni.	Université

Chapitre 1. Introduction

L'imagerie moléculaire *in vivo* est un domaine très en vogue présentement dans la communauté scientifique. Pour cause, l'évaluation des déterminants physiologiques (augmentation de la perméabilité, du flot sanguin ou du pH tissulaire), cellulaires (migration, apoptose, différenciation) et moléculaires (expression et production d'enzymes et de récepteurs, variations du métabolisme) d'une pathologie sont la clé de la médecine personnalisée. Avec l'imagerie moléculaire, un médecin acquiert de l'information au préalable indisponible lui permettant de poser un diagnostic et de proposer un traitement sur mesure pour un patient. Toutefois, de nombreux obstacles et dédales se dressent entre cette vision idéalisée de la médecine et l'état actuel de notre technologie. Les modalités d'imagerie moléculaires actuelles (p. ex. TEP, IRM, IO, TEM) souffrent de nombreuses limitations (résolution, sensibilité, complexité d'analyse), et la co-modalité (l'utilisation de deux ou plusieurs modalités d'imagerie) en est encore à ses balbutiements, si bien que les coûts qui lui sont associés restent élevés.

De plus, le développement de nouvelles molécules pour l'imagerie moléculaire est un processus complexe, comparable au développement de nouveaux composés pharmacologiques. En fait, les objectifs sont semblables : développer une molécule qui peut atteindre une cible, la lier avec une affinité suffisante, et une spécificité suffisante, pendant une période assez longue pour pouvoir jouer son rôle sans effet secondaire, et être éliminée dans un délai raisonnable. Une bonne stabilité de la molécule, physique et biologique, est habituellement un prérequis. Les compagnies pharmaceutiques investissent des milliards de dollars pour effectuer le criblage, la conception rationnelle et l'évaluation de nouveaux composés pharmacologiques – une mesure, s'il en est une, à l'effort nécessaire pour atteindre un résultat satisfaisant. Nous parlons ici d'une **mise au point de la pharmacocinétique** (effet de l'organisme sur la molécule), **de la pharmacodynamique** (effet de la molécule sur l'organisme), **et des caractéristiques biochimiques d'une molécule** – propriétés qui parfois entrent en conflit entre elles.

Cette thèse se veut un résumé et un hommage aux efforts acharnés de notre groupe, des erreurs commises et des solutions trouvées durant le développement d'une classe de molécules visant à détecter l'activité enzymatique de la métalloprotéinase de matrice 2 (MMP-2) *in vivo* de manière non invasive. Il est souhaité que cette thèse expose les pièges possibles dans un tel développement et propose une stratégie rigoureuse pour l'évaluation de l'efficacité de nouveaux composés.

L'introduction est divisée en trois sections, puis est suivie de la justification et l'énoncé de thèse. La première section décrit les MMPs, avec une emphase prononcée sur la MMP-2 afin de familiariser le lecteur avec cette enzyme et ses rôles physiologiques et pathologiques. La seconde section abordera les principales modalités d'imagerie, dont les concepts seront nécessaires à la compréhension de la troisième section. Cette dernière abordera les nombreuses sondes dédiées aux MMPs ainsi que les différentes tentatives d'imagerie des MMPs ayant été publiées. Intégrant les informations des deux premières sections, le lecteur pourra alors apprécier l'ampleur du travail effectué par la communauté scientifique dans le but de parvenir à mieux caractériser cette famille d'enzyme. Finalement, l'énoncé de thèse permettra de clarifier et de préciser les objectifs de ce travail.

1.1 Les métalloprotéinases de matrice

1.1.1 Description générale des MMPs

La famille des MMPs consiste en un regroupement d'environ 24 endoprotéinases (chez l'humain). La présence d'enzymes de type MMPs dans plus d'un règne (chez certaines plantes, invertébrés et vertébrés) suggère que ces protéines évoluent depuis très longtemps (Fanjul-Fernandez *et al.*, 2010). Plusieurs études ont mis en évidence que le gène ancestral a probablement été dédoublé avec le temps, provoquant très tôt dans leur évolution l'apparition d'un nombre important de MMPs et une diversification de leurs domaines respectifs (Massova *et al.*, 1998). Il n'est donc pas surprenant qu'une **superposition des substrats** de certaines MMPs existe (p. ex. MMP-2 et MMP-9), complexifiant l'étude des MMPs individuelles lorsque basée uniquement sur leur activité.

Les MMPs ont été classées en deux catégories principales (Fanjul-Fernandez *et al.*, 2010):

- **Les MMPs archétypes** sont partiellement sous classées en fonction de leur substrat en tant que collagénases (MMP-1, -8 et -13), stromélysines (MMP-3 et -10), matrilysines (MMP-7 et -26) et gélatinases (MMP-2 et -9). Les autres MMPs archétypes ne sont simplement pas classées de la sorte (MMP-12, -19, 20, -27).

- **Les MMPs activées par la furine** possèdent toutes un domaine d'activation spécifiquement reconnu et coupé par les convertases. Cette catégorie comprend 3 MMPs sécrétées (MMP-11, -21 et -28) et 8 MMPs ancrées à la membrane (MMP-14 (ou MT-MMP-1), -15, -16, -17, -23A, -23B, -24 et -25).

Cette classification demeure toutefois l'objet d'un débat (Szabo *et al.*, 2004). Le nom "métallo"protéases réfère à la présence d'un ion Zn^{2+} dans l'ensemble des MMPs qui est essentiel à leur activité. Les MMPs requièrent aussi la présence de deux ions Ca^{2+} afin de fonctionner. Toutes les MMPs comprennent une séquence signal les dirigeant vers la voie de sécrétion cellulaire - confinant la majorité de leur activité au milieu extracellulaire. Les MMPs possèdent aussi un prodomaine responsable d'inhiber l'activité de l'enzyme jusqu'à son activation par d'autres protéases. Certaines MMPs possèdent des

particularités. À l'exception des matrylisines et de la MMP-23, toutes les MMPs possèdent un domaine hémapexine (HPX) lié au domaine catalytique par un domaine penture. Pour les MMPs membranaires, le domaine HPX se termine en un domaine transmembranaire. Les gélatinases (MMP-2 et -9) sont aussi uniques dans la famille, car elles possèdent 3 domaines de type fibronectine (Fi) (Hadler-Olsen *et al.*, 2011). Ces distinctions entre les MMPs, acquises durant l'évolution du gène ancestral, permet à l'organisme de contrôler avec précision le remodelage de la matrice extracellulaire.

Toutefois, bien que collectivement les MMPs soient capables de dégrader l'ensemble de la matrice extracellulaire, il ne s'agit pas d'une fonction prédominante chez les membres de la famille (Ra et Parks, 2007). Des études récentes ont montré que le spectre de substrats des MMPs incluent aussi des cytokines, chémokines, récepteurs membranaires, peptides antimicrobiens (Ra et Parks, 2007) facteurs de croissance, facteurs de coagulation, d'autres protéases ainsi que des protéines d'adhésion cellulaire (Hadler-Olsen *et al.*, 2011). Il est donc essentiel de considérer les MMPs comme étant plus que de simples "Pacmans" de la matrice: avec elles transite aussi une signalisation complexe effectuée par l'activation et la désactivation d'autres molécules, et deux MMPs ne convoient pas nécessairement le même signal.

1.1.2 Découverte et caractérisation moléculaire de la MMP-2

L'étude des enzymes bactériennes possédant la capacité de dégrader la gélatine remonte au début du XX^e siècle, mais la détection de gélatinases humaines est beaucoup plus récente (Evanson *et al.*, 1967; Sopata et Dancewicz, 1974; Sopata et Wize, 1979). Durant les années 80, plusieurs publications ont fait état d'une gélatinase humaine d'un poids moléculaire de ~92 000 Da capable de dégrader le collagène de type IV et émise par les macrophages de lapin (Mainardi *et al.*, 1984) et neutrophiles humains (Hibbs *et al.*, 1985) en réponse à un stimulus biochimique. Quelques années plus tard, la séquence primaire, l'identité de quelques substrats et la séquence d'ADN codant pour cette gélatinase ont été publiées (Wilhelm *et al.*, 1989; Huhtala *et al.*, 1991; Devarajan *et al.*, 1992) – cette information, bien qu'incomplète, a permis de cataloguer cette enzyme avec les autres MMPs.

1.1.3 Structure et domaines de la MMP-2

La structure de la forme inactive de la MMP-2 (proMMP-2) a été résolue par cristallographie (résolution de 2.8Å) et publiée en 1999 (Morgunova *et al.*, 1999) (Fig. 1). La proMMP-2 comprend six domaines : un domaine régulateur (propeptide ou prodomaine), un domaine catalytique, et quatre domaines reliés à la reconnaissance du substrat. Tel que mentionné auparavant, trois sont de type Fi, et le dernier est de type HPX.

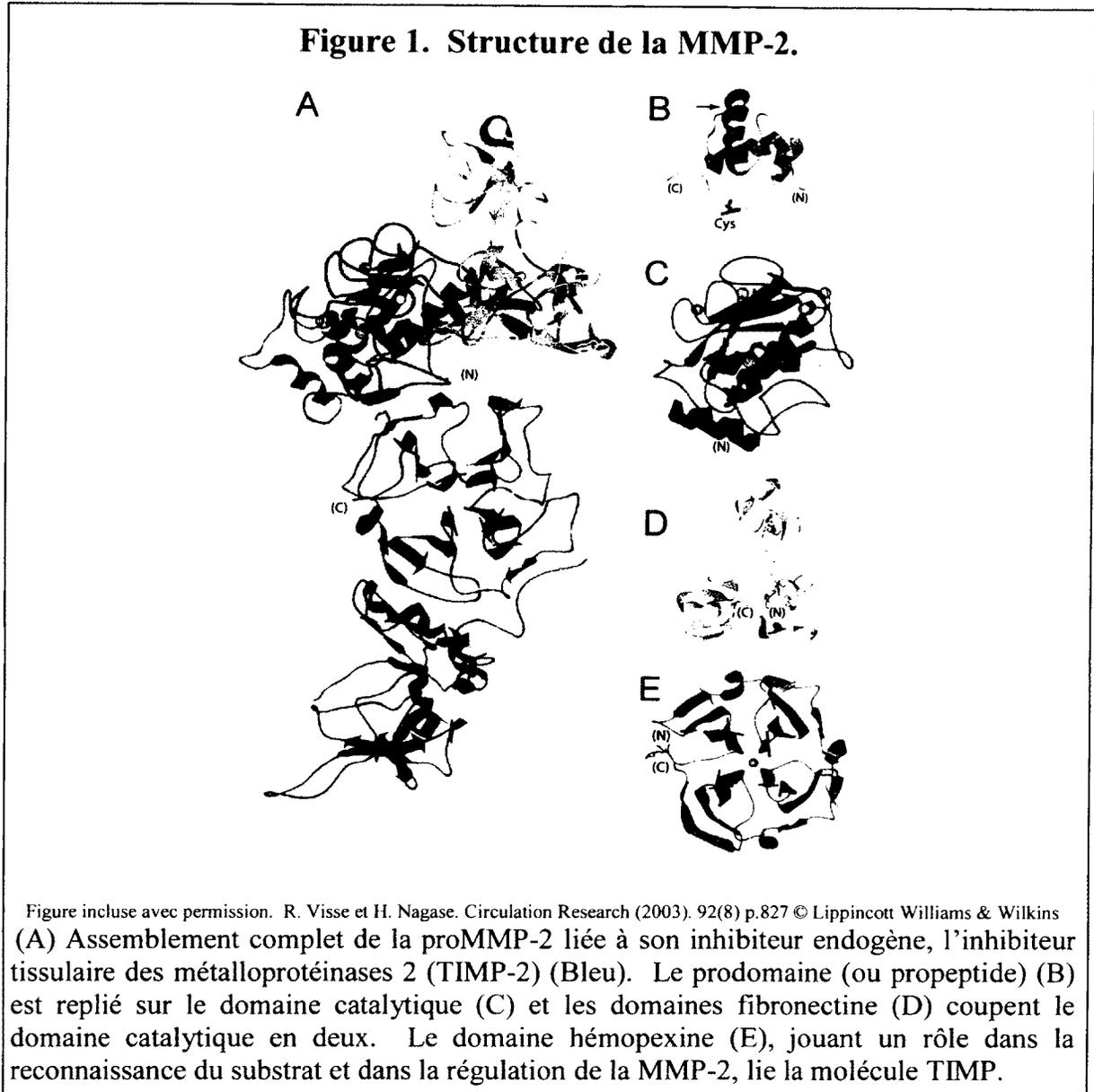
1.1.3.1 Le propeptide

Le propeptide forme un domaine globulaire dissimulant le site catalytique de l'enzyme. Plus particulièrement, une boucle contenant un résidu cystéine est liée à proximité du site par des liens hydrogène. Le groupement thiol de la cystéine interagit avec un ion Zn^{2+} au niveau du site catalytique et réprime l'activité de l'enzyme. Ce résidu est conservé parmi les MMPs. Il a été démontré que le bris de cette interaction mène à l'activation de l'enzyme, un phénomène surnommé « cystein-switch » (Van Wart et Birkedal-Hansen, 1990). *In vivo*, dans le milieu extracellulaire, l'enzyme est principalement activée par le retrait du propeptide, mais d'autres modes d'activation sont possibles. Le propeptide comprend un site de clivage localisé à la surface externe de sa deuxième boucle. Le clivage de ce dernier, par la MT1-MMP (et quelques autres préteases) permet le bris de l'interaction thiol- Zn^{2+} et favorise la dernière étape de l'activation par autocatalyse (Ra et Parks, 2007).

1.1.3.2 Le site catalytique

Le site catalytique, aussi connu sous le terme de « matrixin fold », est un motif conservé parmi les MMPs et comprend trois sites d'ancrage pour le substrat. Deux ions Ca^{2+} et un premier ion Zn^{2+} maintiennent l'intégrité de la structure tertiaire de la protéine et permettent à la MMP-2 de se positionner pour guider le substrat jusqu'au site réactionnel (Diaz et Suarez, 2007). Un deuxième motif, aussi très conservé, comprend trois histidines qui retiennent un ion Zn^{2+} supplémentaire (ce même ion dont il est fait mention dans la description du propeptide). Ce Zn^{2+} est nécessaire pour l'activité de l'enzyme et est positionné à proximité du site réactionnel. Bien que le domaine catalytique de l'enzyme

soit scindé en deux par les trois domaines Fi dans la MMP-2, le repliement de la MMP-2 permet le rapprochement du site réactionnel et du site de chélation du Zn^{2+} catalytique.



1.1.3.3 Les domaines de type fibronectine

Une particularité de la MMP-2 (et de la MMP-9) est la présence de trois domaines similaires à la Fi. Au niveau de la séquence, ces domaines coupent le domaine catalytique en deux – toutefois, au niveau structurel, les domaines Fi sont dissociés du domaine

catalytique. Les domaines Fi possèdent des motifs répétés riches en cystéines, une structure similaire au domaine type 2 de liaison au collagène de la Fi. Leur rôle est de faciliter la liaison des gélatinases au collagène et à l'élastine, augmentant leur vitesse de clivage de ces substrats (Steffensen *et al.*, 1995).

1.1.3.4 Le domaine HPX

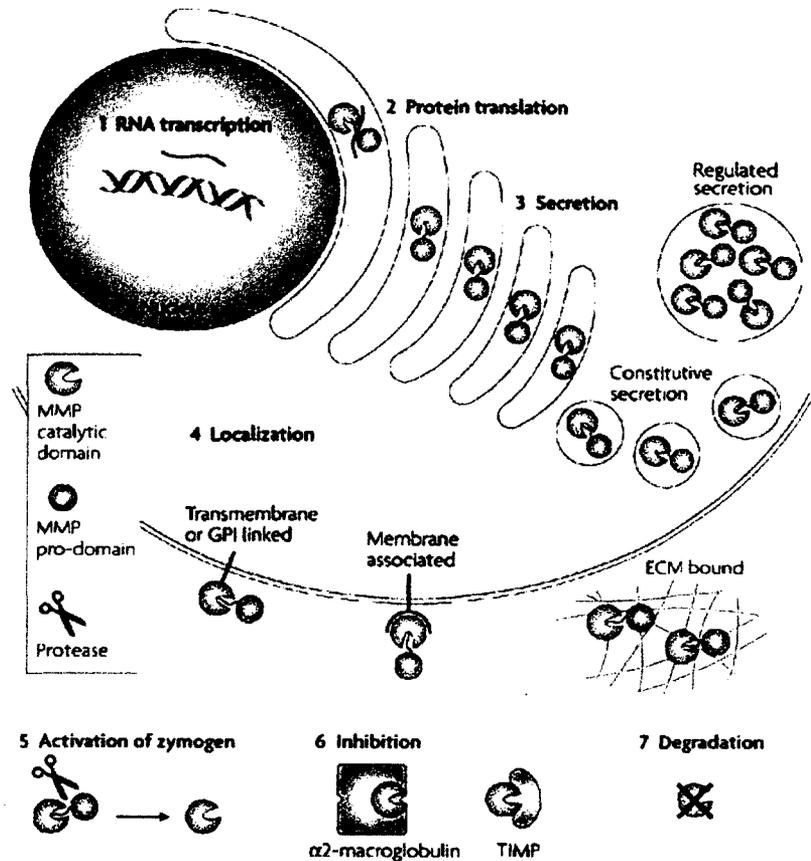
Le dernier domaine possède une structure ressemblant à une hélice à quatre pales et possède des similarités structurelles avec la protéine plasmatique HPX dont le rôle est la récupération de l'hème libérée dans le sang. Sa structure est stabilisée par la présence d'un pont disulfure entre le premier et le quatrième domaine. Deux fonctions ont été attribuées à ce domaine : reconnaissance et liaison du substrat (augmentation de la spécificité) et liaison de l'inhibiteur endogène TIMP-2 (Morgunova *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 2006).

1.1.4 Expression, production et régulation de la MMP-2

Étant donné l'impact important que peut avoir le dérèglement d'une activité protéasique, il n'est pas étonnant que les MMPs soient régulées à plusieurs niveaux (Fig. 2). Cette section consiste en un survol de la régulation, avec emphase sur les éléments qui seront intéressants lorsque la MMP-2 est considérée comme cible pour l'imagerie.

La régulation de la transcription du gène de la MMP-2 est la première étape, et s'effectue grâce à plusieurs sites promoteurs. L'élément principal serait un site reconnu par p53 (le gardien du génome) et AP-2 (protéine activatrice 2, jouant entre autres un rôle clé lors du développement des vertébrés), mais d'autres facteurs de transcription, comme les protéines SP-1 et SP-2 (Specificity Protein, facteurs de transcription), joueraient aussi un rôle.

Figure 2. Régulation des MMPs



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure incluse avec permission. A. McCaw *et al.* Nature Reviews Molecular Cell Biology (2003). 8(3) p.221
© Nature Publishing Group

Étant donné l'importance du remodelage tissulaire, la régulation des MMPs est effectuée à plusieurs niveaux :

- (1) Régulation de l'expression génétique (synthèse de l'acide ribonucléique messager (ARNm))
- (2) Régulation de la traduction (ARNm → protéine)
- (3) Régulation de leur sécrétion
- (4) Localisation (liaison à la membrane ou à leur substrat)
- (5) Activation (par d'autres protéases ou par réaction chimique)
- (6) Inhibition de l'activité par des inhibiteurs endogènes
- (7) Dégradation

À noter, AP-2 et SP-1 sont importants lors du développement embryonnaire qui lui-même implique un remodelage tissulaire, ce qui requiert la présence des MMPs. Dans les sites ischémiques, d'autres facteurs de transcription lient un site AP-1 du promoteur et entraînent son expression (Yan et Boyd, 2007; Clark *et al.*, 2008). La MMP-9 possède des sites communs et d'autres différents de la MMP-2; elle peut être activée en même temps ou suite à des stimuli différents. Il devient donc très important d'avoir un outil nous permettant de différencier entre ces deux enzymes, car leurs rôles et la complémentarité de leurs rôles peut varier entre les pathologies. Puisque la MMP-2 est produite sous une forme inactive (proMMP-2), le retrait du prodomaine est essentiel à son activité. Il a été montré que la MT1-MMP (MP-14) peut catalyser cette transition (Hadler-Olsen *et al.*, 2011). L'activation se fait en une série d'étapes:

1. La MT1-MMP lie une molécule TIMP-2. Cette étape est facultative, mais améliore l'efficacité de l'étape 3;
2. Ce complexe se lie à la proMMP-2;
3. Une autre molécule de MT1-MMP clive la proMMP-2, créant un intermédiaire inactif;
4. Le complexe proMMP-2 semi-activé effectue une autocatalyse afin de compléter son activation.

Il a été montré que les MT2-MMP et MT3-MMP peuvent aussi activer la MMP-2, mais que cette activation n'implique pas TIMP-2. Toutefois, le domaine HPX joue un rôle essentiel. La liaison de la proMMP-2 avec d'autres facteurs et protéases de la matrice, comme l'élastine ou l'héparine, peuvent induire son activation (Ra et Parks, 2007).

La compartimentation et la liaison de la MMP-2 sont aussi des méthodes de régulation. Par exemple, sa capacité à se lier aux intégrines $\alpha_2\beta_3$ permet à une cellule de diriger l'activité de la MMP-2 dans l'espace péricellulaire (Brooks *et al.*, 1996). Tel que décrit

ci-haut, les domaines Fi lui permettent de lier les différents types de collagène. Cette proximité augmente sa capacité à dégrader ces substrats.

La présence de la MMP-2 dans le cytoplasme de cellules myocardiques a été démontrée dans un modèle d'ischémie et ses substrats comprendraient entre autre la protéine TnI, l' α -actinine et la desmine et la chaîne légère de la myosine (Wang *et al.*, 2002). La MMP-2 a aussi été détectée dans le noyau de certaines cellules, mais principalement dans le cas de cellules en apoptose, et serait capable, entre autre, de cliver la poly (ADP-ribose) polymérase (Kwan *et al.*, 2004). Cette translation vers le noyau serait due à une séquence de localisation nucléaire présente dans la portion C-terminale de l'enzyme. Ainsi, en tant que cible pour l'imagerie, il faut tenir compte du fait que la MMP-2 peut se trouver dans ces trois compartiments et que son rôle dans chaque compartiment est potentiellement différent.

1.1.5 Rôles physiologiques et pathologiques de la MMP-2

Une des difficultés majeures de l'étude du rôle individuel des MMPs *in vivo* est que plusieurs d'entre elles sont habituellement présentes au site d'intérêt. La redondance de leurs substrats suggère que la diminution d'expression de l'une peut être compensée par la surexpression d'une autre. Par exemple, les souris déficientes en MMP-2^{-/-} sont viables et simplement plus petites à la naissance, suggérant une redondance des fonctions de la MMP-2 avec d'autres protéases. À noter : Les souris MMP-2^{-/-} MMP-9^{-/-} sont aussi viables, mais pas les souris MMP-2^{-/-} MMP-14^{-/-}, ce qui signifie que l'activité collagénase IV n'est pas essentielle au développement ou que cette dernière peut être conduite par une autre enzyme *in vivo*, et que les fonctions de la MMP-2 sont recoupées par d'autres enzymes dont la MMP-14 (Epstein *et al.*, 2004).

À travers la littérature, le premier constat est que la MMP-2 est présente et active dans plusieurs évènements impliquant la restructuration tissulaire ou la migration cellulaire, et ce, que ces phénomènes soient physiologiques ou pathologiques. La migration cellulaire implique habituellement la séparation des cellules entre elles et le bris de leurs interactions avec la matrice extracellulaire, puis l'ouverture (dégradation) de la matrice

pour faciliter le passage de la cellule. L'hypothèse classique veut que la MMP-2 soit l'une des deux enzymes capables de dégrader le collagène de type IV, qui forme un réseau structuré et crucial pour la stabilisation de la membrane basale (Monaco *et al.*, 2006). Son action serait donc primordiale pour le passage d'une cellule entre les compartiments sanguin et tissulaires, mais cette supposition qui n'est appuyée que par des preuves indirectes a été mise en doute par certaines études ((Ra et Parks, 2007; Chen et Parks, 2009) et références incluses). L'angiogenèse, la morphogénèse (embryogénèse), la réparation tissulaire et la réponse immunitaire sont toutes des phénomènes physiologiques impliquant une migration cellulaire. Il a toutefois été observé que la MMP-2 accélère la migration cellulaire, entre autre par le retrait d'une séquence répressive de la laminine-5 (Giannelli *et al.*, 1997). La MMP-2 est donc impliquée à la fois dans la signalisation et dans la réalisation de la migration cellulaire, mais ces rôles restent imprécis, ce qui rend intéressant la possibilité d'étudier cette enzyme *in vivo*.

La plupart des cellules immunitaires induisent la production, ou produisent elles-mêmes, une vaste diversité de MMPs (Szabo *et al.*, 2004). Les macrophages sécrètent spontanément la MMP-2, alors que les lymphocytes T requièrent une stimulation (Zhou *et al.*, 1993). Les neutrophiles sécrètent un facteur pouvant activer la MMP-2 des cellules endothéliales. Bien que des tests *in vitro* suggèrent que l'activité de la MMP-2 facilite la migration des cellules immunitaires à travers la membrane basale (Leppert *et al.*, 1995), aucune preuve concrète *in vivo* n'a permis de démontrer hors de tout doute si la MMP-2 intervient dans la dégradation de la membrane ou seulement par l'activation de facteurs pro-migratoires dans le milieu. En fait, certaines études récentes ont montré que l'expression de la MMP-2 ne serait pas nécessairement liée à la digestion de la membrane basale par certaines lignées cellulaires (Hua *et al.*, 2011), mais suggèreraient un rôle important dans la signalisation durant la progression tumorale (Bauvois, 2012). Il faut donc garder en tête que la MMP-2 peut être produite par les cellules d'un tissu d'intérêt, ou par des cellules transitant par ce site, et que la régulation de l'expression de la MMP-2 peut dépendre de l'interaction entre les cellules présentes.

La présence d'une haute activité de la MMP-2 est observée dans plusieurs pathologie, dont le cancer (Bjorklund et Koivunen, 2005), l'athérosclérose, l'ischémie (Morancho *et al.*, 2010), ainsi que dans certains dérèglements immunologiques comme l'arthrite (Szabo *et al.*, 2004). Les sous-sections suivantes présentent un bref survol de ces pathologies; la section portant sur le cancer sera plus élaborée puisqu'il s'agit du modèle utilisé dans les manuscrits inclus dans cette thèse.

1.1.4.1 L'athérosclérose

L'athérosclérose est une pathologie entraînant un nombre élevé de complications, incluant des infarctus myocardiques et cérébraux. La cause serait une dysfonction endothéliale qui peut être induite par différents stress (p. ex. taux élevés de LDL ou de radicaux libres, présence de microorganismes infectieux). Ceci causerait une accumulation de lipides et de lipoprotéines suivie par une réponse immunitaire chronique promue par l'accumulation de macrophages tentant d'éliminer ces molécules. L'artère atteinte s'épaissit et se durcit alors que la réponse immunitaire induit la prolifération et l'activation d'autres cellules de l'immunité et de soutien, créant l'apparition d'une plaque. Après un certain temps, la plaque peut se fracturer et un ou plusieurs caillots peuvent ainsi être libérés dans la circulation et bloquer un vaisseau sanguin, entraînant une ischémie (Ross, 1993; Stoll et Bendszus, 2006). Une forte présence de la MMP-2 est détectée au niveau des lésions athérosclérotiques. Des souris ApoE^{-/-} qui développent spontanément ces lésions ont été utilisées dans une étude pour démontrer que la MMP-2 joue un rôle dans le développement des lésions : en effet, les souris ApoE^{-/-} MMP-2^{-/-} développent moins de lésions comparativement aux souris ApoE^{-/-} (Kuzuya *et al.*, 2006). Des études cliniques ont confirmé que la présence de la MMP-2 et de la MMP-9 est corrélée avec certaines complications de l'athérosclérose (Heo *et al.*, 2011). La MMP-2 est donc un marqueur et un acteur intéressant à étudier dans cette pathologie.

1.1.4.2 L'ischémie et l'infarctus

L'ischémie est une interruption de l'apport sanguin dans un tissu. Si cette interruption est trop longue, il y a alors infarctus, c'est-à-dire une nécrose des cellules et une perte de fonctionnalité des tissus affectés. Une augmentation de la production des MMP-2 et

MMP-9 a été détectée dans plusieurs modèles d'ischémie transitoire. Des études récentes suggèrent que les MMPs joueraient un rôle lors de la réparation, mais serait aussi responsable du dégât inflammatoire causé par le retour du flux sanguin dans les tissus (Fan et Schulz, 2012; Nilsson *et al.*, 2012). La présence de la MMP-2 est détectée lors de l'ischémie cérébrale et serait un marqueur précoce de l'infarctus (Etoh *et al.*, 2001). Elle joue un rôle important dans la dégradation des jonctions serrées entre les cellules cérébrales (ouverture de la barrière hémato-encéphalique). La MMP-2 est donc un sujet d'étude intéressant dans les modèles d'ischémie et d'infarctus (Morancho *et al.*, 2010; Kunugi *et al.*, 2011).

1.1.4.3 L'arthrite

L'arthrite est une maladie inflammatoire dont la cause exacte est mal comprise. Elle consiste en une inflammation au niveau des articulations attaquées, menant à une dégénération des tissus. Les MMP-2 et -9 jouent un rôle au niveau du remodelage des tissus dans cette pathologie, et un déséquilibre entre la MMP-2 et son inhibiteur endogène, TIMP-2, a été détecté dans certains cas. L'augmentation de l'expression de la MMP-2 et une diminution de l'expression de TIMP-2 ont été corrélés avec une érosion précoce des os. La MMP-2 serait donc un marqueur intéressant de la progression de l'arthrite (Goldbach-Mansky *et al.*, 2000).

1.1.4.4 Le cancer

Les cellules vivantes sont programmées pour naître, effectuer leur fonction, puis mourir lorsqu'elles ne sont plus aptes à le faire. Leur fonctionnement est parfaitement réglé grâce à l'équilibre des messagers chimiques et facteurs de transcription qui permettent l'homéostasie cellulaire. La cellule est toutefois sous un stress constant et lorsque son matériel génétique est endommagé, il est possible que son fonctionnement devienne anormal. Lorsque le dégât est trop important, cela entraîne la mort cellulaire. Toutefois, si certains gènes clés sont touchés, la cellule est alors incapable d'entrer en apoptose, ou d'indiquer sa condition anormale grâce à l'expression de marqueurs de surface afin d'être détruite par le système immunitaire. Les cellules deviennent alors cancéreuses et la masse qu'elles formeront sera appelée tumeur bénigne (Fig. 3) (Lodish *et al.*, 2000).

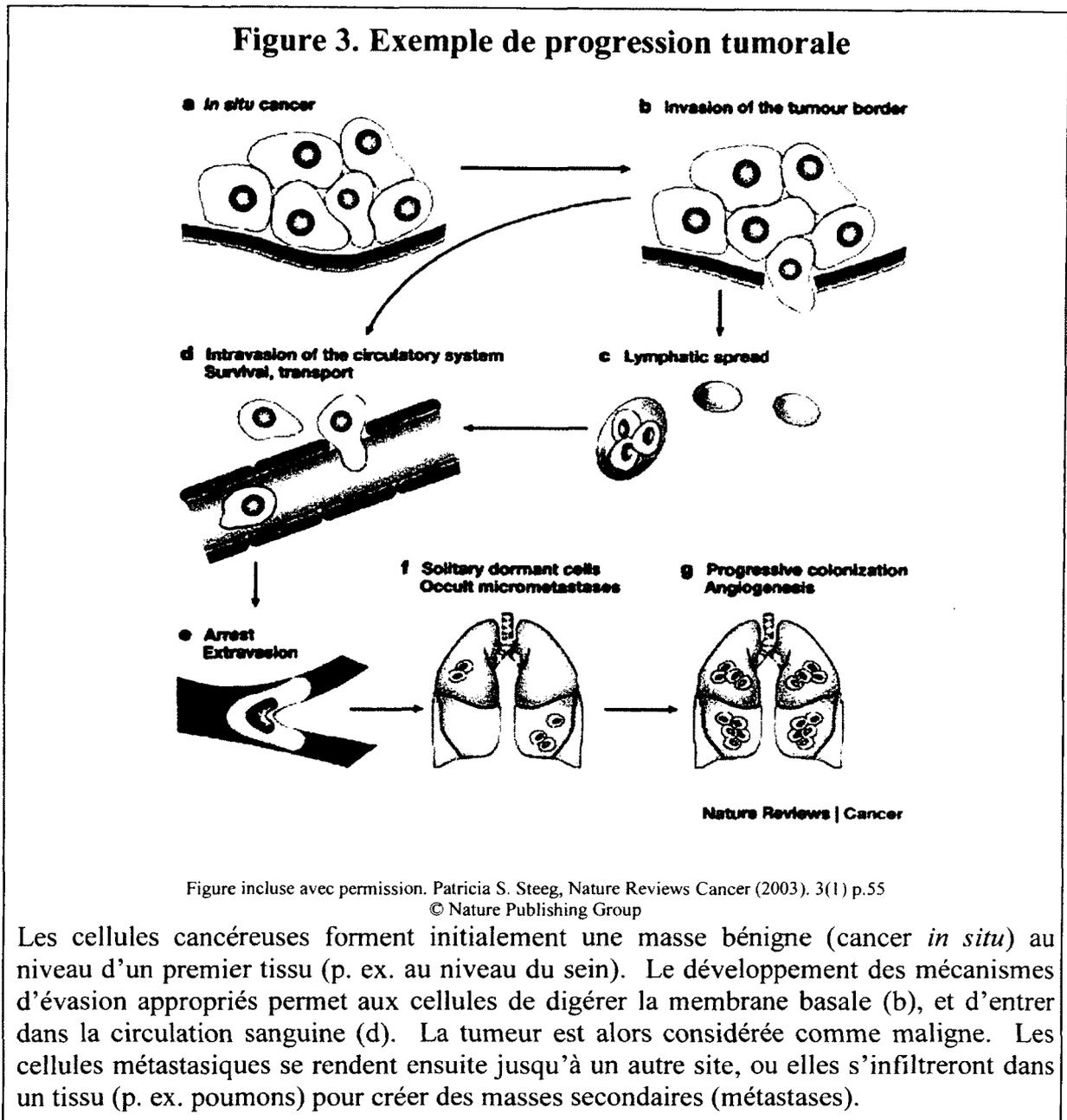
Dans cet état, les cellules se divisent ou entrent en dormance (et peuvent rester dans cet état durant une période variable avant de se mettre à se diviser). La division des cellules cancéreuses n'étant plus régie normalement, un nombre élevé de mutations sont insérées dans le génome. Ces mutations peuvent nuire à la cellule (et éventuellement mener à sa mort) ou l'avantager par rapport aux autres, lui permettant par exemple de se diviser plus rapidement. Le nombre élevé de cellules nécrotiques et apoptotiques ainsi que les signaux biochimiques de détresse produits entraîneront une inflammation chronique au site tumoral. Ceci conduira à la présence d'un nombre élevé de cellules de l'immunité. Des cellules stromales, comme des fibroblastes, seront aussi présentes. Ces deux types cellulaires produiront une variété de facteurs et d'enzymes, comme les MMPs, qui faciliteront la croissance tumorale, ainsi que l'angiogenèse. Toutefois, les rôles exacts des MMPs dans ces processus demeurent obscurs à ce jour (Bjorklund et Koivunen, 2005).

La masse formée par l'amoncellement de cellules cancéreuses est appelé tumeur. Une tumeur peut croître jusqu'à 2 mm avant que son centre ne manque d'oxygène (Lodish *et al.*, 2000). L'hypoxie entraînera un appel de cellules endothéliales et la création de nouveaux vaisseaux sanguins. Toutefois, cette angiogenèse sera anarchique, et les vaisseaux créés auront une fenestration plus hétérogène et importante que celle d'un vaisseau normal. De plus, la perméabilité vasculaire sera augmentée par un nombre important de messagers chimiques, comme la bradykinine et l'oxyde d'azote. Dans le contexte de l'imagerie, ceci permettra aux molécules présentes dans le sang d'entrer plus facilement dans les tissus cancéreux - et facilitera le passage de molécules plus volumineuses. De plus, le drainage lymphatique sera absent ou déficitaire, ce qui causera une accumulation non spécifique des macromolécules dans le tissu. Ces deux phénomènes sont regroupés sous l'appellation "EPR" (« Enhanced Permeability and Retention ») (Maeda *et al.*, 2000; Fang *et al.*, 2003).

L'acquisition d'un phénotype migrateur par certaines cellules cancéreuses fait passer une tumeur de bénigne à maligne. Les cellules avec cette capacité exfiltrent le lit tumoral et entrent dans la circulation (lymphatique ou sanguine) et établissent des métastases à d'autres sites. Afin d'y parvenir, les cellules doivent traverser la membrane basale à la

sortie et à l'entrée. La digestion de cette membrane par les MMPs, dont la MMP-2, faciliterait le passage des cellules. La présence de MMP-2 activée a donc été étudiée comme facteur pronostique pour différents cancers humains, et une corrélation a été trouvée dans plusieurs études (Bjorklund et Koivunen, 2005). Toutefois, des études plus récentes sont venues contredire ces premières hypothèses, et une controverse demeure quand à l'implication réelle de la MMP-2 dans la dégradation de la membrane basale. Plutôt, la MMP-2 serait responsable de l'activation de différentes molécules bioactives qui augmenterait l'inflammation, la survie cellulaire, l'angiogénèse et la migration cellulaire (Hua *et al.*, 2011).

Toutefois, une étude récente a mis en évidence que la production de MMP-2 ne serait pas nécessairement causée par les cellules cancéreuses tentant de sortir, mais pas les cellules des tissus avoisinants tentant de réparer les dégâts causés par la croissance tumorale, et la présence de la MMP-2 a même été corrélée à une croissance tumorale plus lente (Tremblay *et al.*, 2011).



1.1.4.5 Conclusion concernant les implications de la MMP-2

La MMP-2 a été détectée dans plusieurs pathologies, mais ses rôles *in vivo* ne sont pas encore clairement établis puisqu'elle fait partie d'un système complexe et possède une multitude de substrats et d'inhibiteurs endogènes (Bjorklund et Koivunen, 2005). Il est donc primordial d'établir le rôle de la MMP-2 dans une pathologie avant de pouvoir établir avec certitude qu'un traitement avec inhibiteur de MMP-2 est approprié.

1.1.6 Détection expérimentale de la MMP-2

L'expression, la production et l'activation de la MMP-2 peuvent être mesurées par des méthodes biochimiques standard.

L'expression (production d'ARNm à partir de l'ADN) est mesurée par qPCR, une méthode quantitative de réaction en chaîne de la polymérase. Brièvement, l'ARNm est rétrotranscrit en ADN. Cet ADN est ensuite amplifié par une réaction en chaîne grâce à une réaction de polymérisation à l'aide d'une ADN polymérase, de nucléotides et d'amorces (courts segments d'ADN permettant l'ancrage de la polymérase). En suivant la réaction, il est possible de quantifier l'ARN de départ, et donc le niveau d'expression du gène de la MMP-2. Toutefois, ce résultat ne permet pas de décrire la quantité totale de protéines produites à partir de cet ARN, ou leur niveau d'activité.

La production de l'enzyme est habituellement mesurée par immunobuvardage de type western. Brièvement, les protéines d'un tissu ou d'une culture cellulaire sont extraites, puis séparées en fonction de leur volume par migration à travers un gel d'acrylamide. Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane spéciale. En succession, un anticorps primaire (reconnaissant la MMP-2) et un anticorps secondaire (reconnaissant le premier anticorps) sont ajoutés, et permettent de détecter la MMP-2. Cette méthode est semi-quantitative et ceci est principalement dû au fait que la linéarité du signal en fonction de la concentration est restreinte à une petite fourchette de concentration. L'immunobuvardage de type western est une méthode comparative.

L'activité de la MMP-2 peut être détectée par zymographie. Brièvement, les extraits tissulaires/cellulaires sont migrés dans un gel d'acrylamide comprenant un substrat peptidique des MMP-2 et MMP-9. Après une période de renaturation (lavages permettant à l'enzyme de retrouver sa conformation active), une incubation permet à ces MMPs de dégrader leur substrat. Le gel est ensuite coloré, résultant en l'apparition de bandes claires au niveau des MMPs actives (substrat dégradé). La zymographie peut aussi être effectuée directement avec des tranches de tissu (*ex situ*) qui sont mises en contact avec

un gel contenant le substrat, qui est ensuite coloré afin de détecter l'emplacement des MMPs activées (ne permet pas de différencier entre les MMP-2 et MMP-9).

Finalement, l'immunohistochimie permet de détecter la MMP-2. En bref, le tissu est incubé avec un anticorps primaire spécifique à la MMP-2 (l'anticorps peut être spécifique pour une forme particulière de la MMP-2, comme la MMP-2 ne possédant plus son prédomaine). Ensuite, un anticorps secondaire, possédant un groupement pour la détection (fluorophore, radioisotope, enzyme HRP) permet de détecter l'anticorps primaire et de localiser la MMP-2.

Ces méthodes biochimiques sont peu coûteuses, simples et rapides – et sont déjà au point. Elles sont souvent suffisantes pour effectuer des tests *in vitro*. Par contre, pour évaluer l'activité *in vivo*, toutes ces méthodes requièrent un extrait du tissu dans lequel la MMP-2 doit être quantifiée, ce qui est invasif. Or, il survient parfois que la biopsie est impossible (p. ex. tumeur cérébrale à un endroit ne pouvant être atteint sans danger). Malgré ses coûts élevés et sa complexité, l'imagerie moléculaire devient alors une alternative intéressante. De plus, les méthodes biochimiques habituelles ne permettent pas de localiser l'activité détectée chez le sujet, ni de sonder l'inhomogénéité d'un tissu, sauf si de multiples échantillons de localisation connus sont prélevés, ce qui est limitant du point de vue expérimental ou lorsqu'un suivi longitudinal est désiré. Finalement, la plupart des méthodes biologiques décrites ici (sauf la zymographie *ex situ*) négligent de détecter le niveau d'inhibition de la MMP-2 par les inhibiteurs endogènes, qui jouent un rôle important dans la régulation. Ainsi, pour sonder l'activité réelle de la MMP-2 et la localiser, l'imagerie est un outil de choix.

1.2 L'imagerie moléculaire et les modalités d'imagerie

L'imagerie biomédicale est une science complexe et multidisciplinaire. La mise au point de l'appareillage nécessaire, comme celle d'un tomographe optique ou d'un scanner IRM, repose sur des principes d'ingénierie et de physique avancés. Le traitement des données peut parfois s'avérer complexe et requiert l'intervention de mathématiques poussées et l'élaboration de programmes informatiques afin de les appliquer. La préparation de molécules nous permettant de cibler des phénomènes physiologiques ou pathologiques d'intérêt nécessite un vaste savoir-faire en chimie. Finalement, la compréhension de la pharmacodynamique et de la pharmacocinétique d'une molécule demande une solide base en biologie, en biochimie et en pharmacologie. Afin de pouvoir atteindre un objectif en imagerie, chacun de ces éléments doivent être disponibles au sein de l'équipe de recherche.

L'imagerie moléculaire consiste en l'utilisation d'une modalité d'imagerie (p. ex. l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la tomographie d'émission monophotonique (SPECT), la tomographie par émission de positron (TEP), l'imagerie optique de fluorescence (IOF), et la tomodensitométrie (TDM)) dans le but d'étudier une molécule (endogène ou exogène) particulière dont la distribution spécifique devient le centre d'intérêt. Dans le cas d'une molécule exogène, celle-ci est initialement conçue afin de cibler une molécule endogène (p. ex. un récepteur ou une enzyme) *in vivo*, cibler un type d'environnement (p. ex. acide, oxygéné) ou un type cellulaire. L'interaction d'une molécule avec sa cible aura parfois pour effet de modifier le signal qu'elle génère et/ou de modifier sa cinétique (en la piégeant par exemple). La modalité permet de détecter la variation de signal entraînée par la présence (et l'activation, le cas échéant) de la sonde (Weissleder *et al.*, 2010).

1.2.1 Comportement des sondes *in vivo*

Les principales difficultés de l'imagerie moléculaire viennent du fait que les sondes sont imparfaites et sont utilisées dans un système biologique complexe. La liste suivante a été librement tirée entre autre de la référence (Weissleder *et al.*, 2010) ainsi que de la

synthèse des nombreux articles présentés dans la section d'imagerie. Il s'agit d'une synthèse non exhaustive ou exclusive effectuée par l'auteur de cette thèse:

- **Les sondes**

- interagissent avec des cibles secondaires;
- possèdent un signal avant d'être activées, ou leur signal est influencé par l'environnement dans lequel elles se trouvent;
- ont des propriétés qui les empêchent ou les aident à atteindre la cible *in vivo*, mais de manière inégale d'un tissu à un autre;
- sont métabolisées.

- **Les cibles**

- sont parfois réparties dans l'ensemble de l'organisme et non seulement au site d'intérêt;
- sont en concentration finie et parfois insuffisante (dans le cas d'une sonde liant sa cible 1 pour 1, la concentration de la cible doit suffire pour qu'une concentration égale de sonde soit détectable par la modalité d'imagerie);
- sont parfois mobiles ou inaccessibles (p. ex. sécrétée dans le sang ou intracellulaire).

- **La physiologie du sujet joue aussi un rôle crucial**

- la filtration de la sonde par le foie et les reins peut empêcher la sonde de s'accumuler au site ciblé (et cause l'accumulation dans un ou plusieurs organes d'excrétion, provoquant un bruit important);

- la perméabilité des vaisseaux sanguins est insuffisante pour laisser entrer la sonde dans un tissu (problème important au niveau du cerveau);
- le flux sanguin du tissu d'intérêt est faible.

Le signal observé résulte de la conjonction de ces phénomènes ce qui rend l'interprétation des résultats est extrêmement difficile, même avec des contrôles permettant de quantifier la plupart de ces effets.

Malgré cette complexité, et les coûts élevés reliés au maintien de l'infrastructure qui lui est nécessaire, l'imagerie biomédicale comporte d'importants avantages (Weissleder *et al.*, 2010) par rapport aux méthodes biochimiques et pharmacologiques classiques :

- suivi longitudinal (l'animal n'a pas à être euthanasié à chaque point temporel de l'étude);
- étude non-invasive (ou peu invasive) et *in vivo*, permettant d'étudier une cible dans son environnement habituel.

1.2.2 Les modalités d'imagerie TEP, TEM et TDM

Afin de permettre au lecteur de suivre le fil de cette thèse plus aisément, trois modalités d'imagerie seront discutées conséquemment dans cette section. Celle-ci est une introduction brève des principes de la tomographie d'émission par positrons (TEP), la tomographie par émission monophotonique (TEM) la tomodensitométrie (TDM) et de leurs agents.

1.2.2.1 Imagerie TDM

L'utilisation d'une source de rayons X permet d'obtenir une carte de la densité du sujet. La source et une caméra diamétralement opposées effectuent une rotation autour du sujet. Les données (projections) acquises permettent de réaliser une reconstruction tomographique du coefficient d'extinction de chaque voxel d'un sujet. L'imagerie TDM est principalement une modalité anatomique. L'utilisateur peut ainsi distinguer entre un

tissu mou (p. ex. gras), un tissu dense (p. ex. tumeur) et les os. Certains agents de contraste permettent d'ajouter de l'information aux images TDM, mais ces derniers doivent être en concentration très élevée. L'imagerie TDM est souvent associée à l'imagerie TEM ou TEP afin de fournir un support anatomique à ces deux modalités qui sont plutôt fonctionnelles ou moléculaires.

1.2.2.2 Imagerie TEM

L'imagerie TEM consiste en l'acquisition de données à l'aide d'une caméra gamma en rotation autour d'un sujet, avec comme source de signal un ou plusieurs radiotraceurs injecté(s) au sujet, et dont la désintégration nucléaire résulte en l'émission de rayons gamma. Les données obtenues sur un ensemble de projections sont ensuite utilisées par un algorithme dit de tomographie assistée par ordinateur, résultant en l'obtention d'une carte 3D de la distribution du radio-isotope (Cherry *et al.*, 2003) il s'agit donc d'une modalité moléculaire ou fonctionnelle et non anatomique. La plupart des radiotraceurs pour la TEM sont des molécules auxquelles un chélateur est ajouté, afin d'y piéger un radiométal (p. ex. ^{111}In), quoique certains atomes puissent être intégrés directement dans une molécule ou être utilisés seuls (p. ex. ^{123}I) (Cherry *et al.*, 2003).

1.2.2.3 Imagerie TEP

Tout comme la TEM, la TEP utilise des radioisotopes, mais seulement ceux dont la désintégration mène à l'émission d'un positron, l'antimatière de l'électron. L'annihilation du positron lors de sa rencontre avec un électron cause l'émission de deux photons de 511 keV dans des directions opposées. La TEP utilise la détection simultanée de ces deux photons (coïncidence) pour créer une carte de la concentration de l'émetteur radioactif en 3D après une reconstruction tomographique. La TEP est donc une modalité moléculaire ou fonctionnelle et ne fournit pas ou peu d'information anatomique. Les radioisotopes utilisés en TEP (p. ex. ^{11}C , ^{13}N , ^{18}F) peuvent être liés directement dans la molécule traceur, alors que d'autres (p. ex. ^{64}Cu , ^{67}Ga) doivent être chélatés avec un groupement approprié (Cherry *et al.*, 2003).

1.2.3 L'imagerie par résonance magnétique

L'IRM est une modalité d'imagerie basée sur la manipulation et la détection du magnétisme (moment magnétique) des atomes possédant un spin nucléaire non nul et demi-entier (p. ex. ^1H , ^{31}P). Habituellement, ainsi que dans le cadre de cette thèse, ce sont les protons d'hydrogène de l'eau du sujet qui sont imagés. Bien qu'une description détaillée des principes sous-jacents soit hors de la portée de cette thèse, cette section résume de manière simple les éléments essentiels à la compréhension des sections suivantes. Les lecteurs désirant un exposé plus détaillé concernant l'IRM sont invités à consulter les références sur les principes généraux (Nishimura, 1996) et sur les agents de contraste (Lowe, 2004; Yoo et Pagel, 2008) ayant servi à l'élaboration de cette section.

Principes de base de l'IRM :

- Un champ magnétique principal statique et homogène (B) de très haute intensité est utilisé pour aligner les moments magnétiques selon un axe (référé en tant qu'axe Z). L'intensité de ce champ est souvent incluse dans la description d'un scanner IRM (p. ex. IRM 7T, pour 7 Tesla).
- Une impulsion (ou plusieurs impulsions) de radiofréquence (RF) est utilisée pour mettre les moments magnétiques en phase, et les faire pivoter selon un angle α par rapport à l'axe Z . Les spins sont toutefois en résonance avec une fréquence particulière, ω , qui est déterminée par l'intensité du champ magnétique affectant un moment magnétique particulier via la relation de Larmor ($\omega = \gamma B$), où γ est le rapport gyromagnétique de l'atome observé.
- Deux phénomènes de relaxation surviennent 1) les moments se déphasent (relaxation transversale ou spin-spin), et 2) l'énergie absorbée par les spins est réémise, ce qui conduit à un réalignement en Z (relaxation longitudinale ou spin-réseau).

- Durant ce temps, les moments magnétiques réémettent collectivement un champ RF qui induit un signal électrique dans une antenne et qui est décodé par la console.

Des champs magnétiques supplémentaires (gradients) sont utilisés pour encoder l'information spatiale tant à l'excitation qu'à la lecture (en faisant légèrement changer le champ magnétique ressenti par chaque voxel d'un volume). L'intensité des impulsions, ainsi que les délais entre les impulsions permettent de générer différents contrastes.

Tel que mentionné ci-haut, il existe deux phénomènes de relaxation qui sont chacun décrits par une fonction exponentielle :

- L'interaction des spins magnétiques entre eux cause leur déphasage. Ce phénomène de relaxation spin-spin est relativement rapide et est décrit par une constante de temps T_2 . En pratique, une contribution provenant de l'inhomogénéité locale du champ magnétique s'ajoute à ce déphasage. On définit alors la constante de temps T_2^* .
- Les moments magnétiques interagissent avec les champs magnétiques de leur environnement pour leur redonner l'énergie absorbée, ce qui favorise leur réalignement avec le champ magnétique principal (axe Z). Ce phénomène de relaxation spin-réseau est relativement lent et est décrit par une décroissance exponentielle inversée (remontée de la magnétisation selon Z) avec une constante de temps T_1 .

Dans tous les cas, les deux phénomènes sont présents, mais en ajustant la séquence des impulsions RF d'excitation, il est possible de pondérer les images davantage selon l'une, l'autre ou les deux constantes de temps – et ainsi générer le contraste désiré (mettant les tissus/structures d'intérêt en évidence). L'intensité du signal sera aussi proportionnelle à la densité des moments magnétiques d'intérêt. L'équation permettant de calculer le signal d'un voxel est la suivante (Landis *et al.*, 2000) :

$$S_0 = S_- [1 - \exp(-TR/T_1) \times \cos \alpha] ([1 - \exp(-TR/T_1)] \times \sin \alpha \times \exp(-TE/T_2^*))^{-1} \quad [\text{Éq. 1}]$$

où S_0 est le signal mesuré du voxel, S_- est le signal à l'équilibre et est proportionnel à la densité protonique, TE et TR sont les temps d'écho et de répétition (paramètres de la séquence des impulsions RF). En effectuant une régression de cette équation à plusieurs angles α , il est possible de calculer T_1 , à condition de minimiser l'impact de T_2^* (avec $TE \ll T_2^*$). La partie soulignée de l'équation 1 devient alors égale à 1, et peut être ignorée.

Il est possible de modifier le contraste obtenu en modifiant localement les temps T_1 et T_2 à l'aide d'agents de contraste (CA).

- T_2^* est influencé par les champs magnétiques présents dans l'environnement, comme celui créé par une particule d'oxyde de fer. Les particules magnétiques sont utilisées comme agents de contraste T_2 et produisent un contraste négatif.
- T_1 est influencé par la présence de molécules paramagnétiques, comme le Gd^{3+} et l'oxygène. Ces molécules sont utilisées pour influencer le contraste T_1 . L'impact sur T_1 est donné par l'équation suivante :

$$\frac{1}{T_{1,obs}} = \frac{1}{T_{1,int}} + rC \quad [\text{Éq. 2}]$$

où r est la relaxivité, une mesure de l'efficacité d'une molécule à affecter la relaxation des protons avoisinants, dont les unités sont $s^{-1}M^{-1}$. C est la concentration du CA, $T_{1,int}$ est le T_1 intrinsèque, et $T_{1,obs}$ est le T_1 observé en présence du CA.

Il est important de souligner que les agents présentés ci-haut n'ont pas de signal intrinsèque : c'est l'influence de ces agents sur la relaxation des moments magnétiques de l'eau environnante qui modifie le contraste d'une image.

L'IRM est une modalité principalement anatomique (résolution élevée). Des séquences d'impulsions permettent de mettre en évidence certains phénomènes physiologiques

(augmentation de la concentration locale d'oxygène) ou pathologiques (accumulation de dépôts protéiques de la maladie d'Alzheimer). Des agents de contraste sont aussi développés afin de mettre en évidence des cibles moléculaires. La principale barrière dans les deux cas est la nécessité d'atteindre des concentrations moléculaires locales relativement élevées pour être détectés (c.-à-d. 10^{-5} - 10^{-3} mol/L pour un agent T_1 standard comme le Gd-DTPA (acide diéthylènetriaminepentaacétique)).

1.2.4 L'imagerie optique

L'imagerie optique (IO) est une modalité relativement récente et regroupe plusieurs classes d'imagerie basées sur la détection de la luminescence, c'est-à-dire l'émission de lumière ne résultant pas d'une excitation thermique (incandescence). Cette section survolera les concepts clés de l'interaction entre la lumière et les tissus avant de décrire les modes d'excitation utilisés en imagerie optique, avec une section détaillée concernant la fluorescence qui est d'un intérêt particulier pour la présente thèse.

1.2.3.1 L'imagerie optique in vivo : concepts et limitations

L'interaction entre la lumière et les tissus est un processus complexe. La présente section est destinée à mettre en évidence et à vulgariser les principes nécessaires à la compréhension de cette modalité. Le lecteur désirant avoir plus de détail est dirigé vers l'ouvrage de Wang et Wu dont l'auteur s'est inspiré ici (Wang et Wu, 2007).

Les tissus comprennent différentes molécules capables d'absorber les photons s'y propageant. Les principaux absorbeurs sont l'eau, la mélanine et l'hémoglobine (Fig. 4). Les photons sont captés et leur énergie est dissipée par les absorbeurs de manière non radiative. La probabilité de captation μ_a permet de calculer l'atténuation lumineuse après son parcours sur une distance x en utilisant la loi de Beer :

$$I(x) = I_0 \exp(-\mu_a x) \quad [\text{Éq. 3}]$$

De plus, les structures biologiques (p. ex. les cellules et leurs composantes, comme les membranes, mitochondries, noyau) interagissent et dispersent la lumière : plus la taille d'une structure s'approche de la longueur d'onde du photon, plus la probabilité de

dispersion, μ_s , sera élevée. À nouveau, il est possible de calculer la proportion de photons qui seront transmis (T) sans être déviés (photons ballistiques) avec une équation similaire à la loi de Beer :

$$T(x) = \exp(-\mu_s x) \quad [\text{Éq. 4}]$$

Toutefois, lorsqu'une image n'est pas prise en considérant le temps de vol, le signal observé comprendra les photons ballistiques et les photons dont la course a été modifiée (photons diffusés), ce qui génèrera un halo lumineux autour de la trajectoire ballistique (diffusion de la lumière). C'est entre autres le cas avec l'appareillage disponible au CHUS (QOS de Quidd), dont les acquisitions sont effectuées sur quelques secondes.

Figure 4. Principaux spectres de coefficients d'absorption *in vivo*

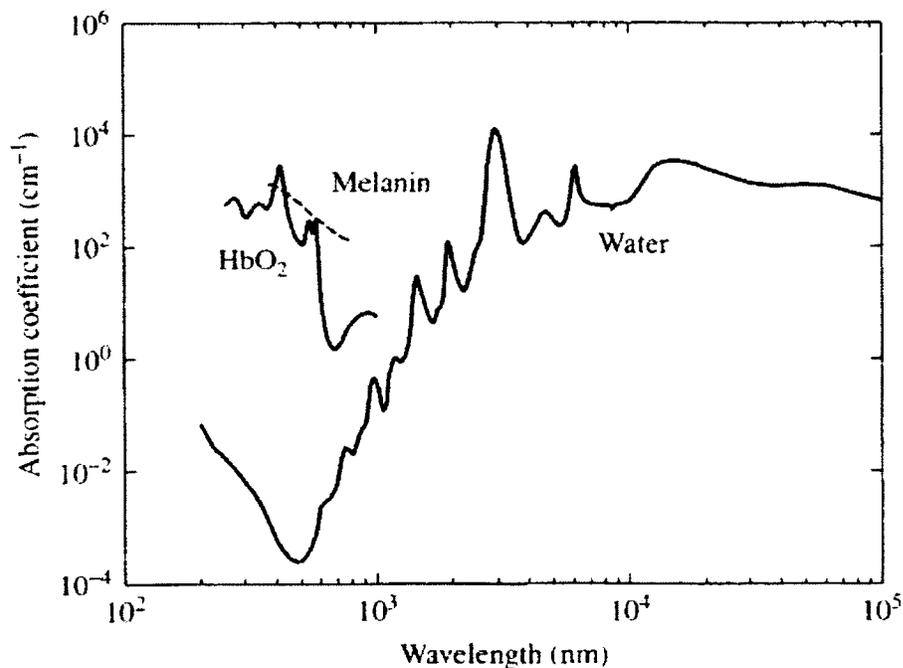


Figure incluse avec permission. Lihong V. Wang et Hsin-i Wu, Biomedical Optics: Principles and Imaging (2007), © John Wiley and Sons

Coefficient d'absorption en fonction de la longueur d'onde pour la mélanine, l'eau et l'hémoglobine (HbO₂), les trois principaux absorbeurs *in vivo*. L'absorption minimale est située dans la région du proche infrarouge (650-800 nm).

La somme de ces deux phénomènes permet de calculer le coefficient d'extinction d'un milieu, μ_T , tel que :

$$\mu_T = \mu_a + \mu_s \quad [\text{Éq. 5}]$$

Afin d'optimiser une expérience d'imagerie, il est important d'utiliser une sonde moléculaire dont le signal se propage à une longueur d'onde dont l'extinction est minimale. La région du proche infrarouge (650-800 nm) est particulièrement propice pour cela.

1.2.4.2 La luminescence

La luminescence est une émission radiative suivant l'excitation d'une molécule. Le mode d'excitation de la molécule est utilisé pour décrire le sous-type d'imagerie optique.

- **Excitation par absorption d'un photon : Fluorescence.** La fluorescence nécessite une molécule possédant un groupement chimique dont un des électrons peut absorber les photons d'une certaine énergie (ou une somme de photons d'une certaine énergie). Après une réorganisation électronique initiale (relaxation vibrationnelle ou conversion interne), un photon est émis dont l'énergie est inférieure à celle absorbée.
- **Excitation par réaction chimique : Chimiluminescence et bioluminescence.** Un réarrangement moléculaire lors d'une réaction chimique résulte en un état moléculaire instable (excité). Dans le cas de la chimiluminescence, la stabilisation de cet état s'effectue entre autre par l'émission d'un photon. Similaire à la chimiluminescence, la bioluminescence est un cas spécifique où la réaction chimique est catalysée par une enzyme.
- **Excitation par le passage d'une molécule chargée à une vitesse excédant la vitesse de propagation de la lumière dans ce milieu : Effet Čerenkov.** Le passage d'une particule chargée perturbe le moment magnétique des molécules d'un milieu. Normalement, les photons émis lors de la relaxation du milieu interfèrent de manière destructive. Dans le cas où la propagation de la particule est plus rapide que la propagation de la lumière dans ce milieu, l'interférence devient constructive, et la luminescence est alors amplifiée. L'analogie habituelle

pour illustrer le phénomène est celui d'un front d'onde sonore lorsqu'un objet se déplace au-delà de la vitesse du son (boom supersonique). Cet effet est responsable de la luminescence observée dans les réacteurs nucléaires, mais peut aussi être détecté après l'injection d'un radioisotope ou d'une molécule comprenant un radioisotope dans un animal.

1.2.4.3 La fluorescence

Une molécule fluorescente peut absorber l'énergie de photons et la réémettre en partie sous la forme d'un photon d'énergie moindre. L'efficacité de l'absorption dépend de (a) l'énergie du/des photon(s) (et donc de sa longueur d'onde) et (b) de l'énergie nécessaire pour exciter le fluorophore – ces deux quantités devant correspondre. L'interaction entre le fluorophore et le photon provoque l'apparition d'un dipôle électrique ou moment de transition (McNaught et Wilkinson, 1997). Après l'excitation, une relaxation partielle permet d'atteindre le niveau le plus stable de l'état excité (perte d'énergie par conversion interne). La molécule peut alors poursuivre sa relaxation soit de manière non radiative (p. ex. par vibration ou autre dissipation thermique) ou encore par l'émission d'un photon dont l'énergie sera inférieure à celle du photon absorbé. La différence d'énergie (et de longueur d'onde) est nommé décalage de Stokes (« Stokes Shift »). L'état instable doit avoir une demi-vie très courte pour que l'émission soit nommée fluorescence – sinon, il s'agit plutôt de phosphorescence (Davidson, 1998). Un fluorophore peut être plus ou moins efficace pour absorber la lumière, une valeur physique nommé le coefficient d'extinction. Ce fluorophore peut ensuite être plus ou moins efficace à réémettre l'énergie sous forme de photons, une propriété nommée rendement quantique. Ces deux propriétés dépendent de la nature de la molécule et de l'environnement (température, pH, composition du solvant). Il est à noter que les fluorophores sont sujets à être désactivés par photoblanchiment (Fig. 6).

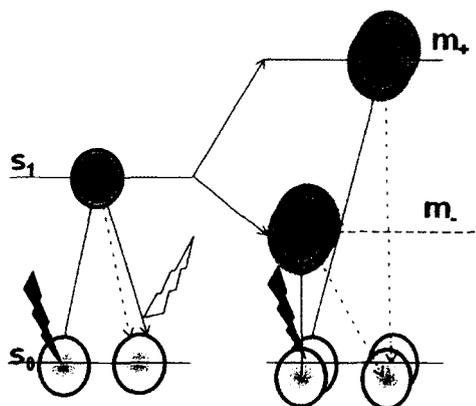
Il existe sur internet plusieurs sources d'information sur les fluorophores et les spectres d'émission et d'excitation qui leur sont associés. L'un de ces outils est le « Fluorescence Spectra Viewer » développé par *Invitrogen* (Invitrogen, 2012), mais il existe des plages avec des listes plus complètes de fluorophores (CMMI, 1996). Le Cy5 est un fluorophore

typique et est décrit à l'annexe I. Ce dernier est utilisé pour la fabrication d'une sonde optique dans le cadre du chapitre 4 de cette thèse.

1.2.4.4 Groupements atténuateurs et auto-atténuation

Les groupements atténuateurs (accepteurs) sont utilisés en paire avec les groupements fluorescents (donneurs) pour former une paire FRET (Förster Resonance Energy Transfer). Le FRET est un transfert d'énergie non radiatif entre le fluorophore et le groupement atténuateur (McNaught et Wilkinson, 1997). L'énergie transférée est par la suite dissipée sous forme thermique par l'atténuateur. La présence d'un atténuateur réduit donc les chances que le fluorophore réémette un photon. L'efficacité du FRET dépend de trois facteurs : (1) la distance entre les deux groupements, (2) la superposition des spectres d'énergies d'émission du fluorophore et d'absorption de l'atténuateur et (3) l'alignement/orientation des dipôles de transition de l'accepteur et du donneur.

Figure 5. Fluorescence et agrégation H



La fluorescence est initiée par l'excitation d'un fluorophore, une molécule qui initialement à l'état stable (S_0), passe à un état excité (S_1). Après la conversion interne d'une partie de l'énergie, le fluorophore retourne l'énergie sous forme vibrationnelle (non radiative, flèche pointillée), ou sous la forme d'un photon (fluorescence) de moindre énergie (flèche pleine). Dans le cas de l'agrégation H (à droite sur la figure), l'interaction des moments de transition de deux ou plusieurs molécules fluorescente provoque l'apparition de nouveaux états excités, dénotés m_+ et m_- (à noter, le niveau m_- est interdit si l'alignement est parfaitement parallèle). Le retour à l'état S_0 se fait de manière non radiative.

L'autoatténuation est un phénomène par lequel un fluorophore interagit avec un groupement identique, résultant en une diminution de son rendement quantique. Par exemple, l'agrégation de deux ou plusieurs molécules fluorescentes cause une interaction de leur moment de transition. Les agrégations parallèle ou antiparallèle sont référées en tant qu'agrégations H et J, et provoquent l'apparition de nouveaux états excités (Behera *et al.*, 2007). Ces niveaux sont détectés expérimentalement par la modification de l'emplacement et de la largeur du spectre d'absorbance. Il est important de noter que les agrégats ne sont pas fluorescents (désexcitation vibrationnelle) (Berlier *et al.*, 2003). L'agrégation H sera particulièrement d'intérêt dans cette thèse (Fig. 5).

Figure 6. Photoblanchiment

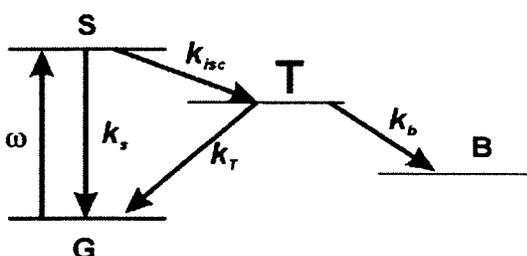


Figure incluse avec permission. Füreder-Kitzmüller, Erwin et al., Chemical physics letters (2005). 404(1-3). P13
© ELSEVIER BV

Les molécules dans un état fondamental stable (G) sont excitées par une source de photons de longueur d'onde appropriée, et amenés dans un état excité (S). La molécule passe ensuite par un état transitoire (T) avant de réémettre l'énergie sous la forme d'un photon et retourner à l'état fondamental (G) en émettant de la lumière (fluorescence). L'énergie réémise étant moindre que celle absorbée, la longueur d'onde en sera augmentée. Les molécules à l'état de transition (T) sont susceptibles de réagir avec les espèces réactives de l'oxygène et de former un complexe inexcitable (B).

1.2.4.5 L'imagerie moléculaire par fluorescence

Une molécule fluorescente est initialement injectée, et sa distribution est suivie grâce à un système optique. Ceci requiert une source initiale de photon pour l'excitation (lasers, lampes incandescentes). Dans le cas de l'appareil utilisé durant cette thèse (QOS), une source incandescente polychromatique est filtrée afin de sélectionner la bande énergétique

appropriée, c'est-à-dire ne laisser passer que les photons dont l'énergie correspond environ au maximum d'excitation du fluorophore.

Une partie des photons d'excitation est absorbée par le fluorophore, qui réémet des photons de plus basse énergie (émission). Le reste des photons sont réfléchis, diffusés et/ou absorbés par le milieu – avec pour résultat un signal brut constitué d'un mélange de photons d'excitation et d'émission. Grâce à la différence d'énergie entre les deux types de photons (« Stokes Shift »), il est possible de filtrer et de sélectionner les photons provenant uniquement de la fluorescence. Le filtre d'émission doit être ajusté en conséquence afin que les plages de longueurs d'ondes d'excitation et d'émission soient mutuellement exclusives (i.e. idéalement qu'elles ne se chevauchent pas).

Pour optimiser les images obtenues, il est possible de modifier les paramètres d'acquisition. Augmenter le temps d'acquisition ou la sensibilité du détecteur permet d'améliorer le contraste de l'image, c'est-à-dire la résolution entre deux niveaux de signal. Par contre, peu importe le temps d'acquisition ou la sensibilité de la caméra, le ratio entre le signal (émission) et la contamination/pollution (excitation) sera fixe. Il est possible de réduire le ratio signal/contamination en augmentant la concentration de fluorophore, en employant une source excitatrice mieux adaptée, soit plus spécifique et positionnée afin de minimiser la réflexion vers le détecteur, ou en utilisant des filtres plus efficaces.

1.3 L'imagerie des MMPs

Au début de la dernière décennie, un fort engouement de la communauté scientifique pour les MMPs et leurs rôles dans la progression métastatique a propulsé les premiers prototypes d'inhibiteurs de MMP en tests cliniques. Les difficultés inhérentes à la détection des enzymes et de leur activité *in vivo*, difficultés encore bien présentes, ont fait en sorte que plusieurs équipes de chimistes se sont tournées vers les structures d'inhibiteur nouvellement publiées afin de concevoir des traceurs TEP et TEM pour l'imagerie non invasive des MMPs. En parallèle, l'imagerie optique *in vivo*, encore jeune mais pleine de promesses, a fait son entrée. Se basant sur les outils et les sondes moléculaires développés au cours des années 90 par les biologistes cellulaires et moléculaires, les pionniers de l'imagerie optique ont synthétisé des sondes moléculaires intelligentes, c'est-à-dire presque indétectables initialement, puis fluorescentes lorsque reconnues et activées (coupées) par leur(s) MMP(s) cible(s). Il a fallu un certain moment avant que l'IRM et les agents de contraste associés dans cette course. Ce n'est qu'en 2007 que le premier prototype de sonde activable IRM ciblant une MMP (solubilité différentielle) a été publié (Lepage *et al.*, 2007).

Cette section décrit les principales collaborations scientifiques au domaine de l'imagerie des MMPs, avec un certain emphase sur la MMP-2. Pour des revues sur l'imagerie des MMPs, le lecteur est référé aux articles par (Van de Wiele et Oltenfreiter, 2006) , (Wagner *et al.*, 2006) [Focus sur la TEP et la TEM] et par (Scherer *et al.*, 2008) [Focus sur l'optique].

Il est important de souligner que les critiques présentées dans cette section sont extrêmement sévères. Lorsque des failles sont soulignées, il ne s'agit pas de blâmer les auteurs, mais plutôt de mettre en évidence la difficulté d'avoir une étude complète et des contrôles suffisamment solides pour prouver, hors de tout doute, qu'une sonde est belle et bien spécifique et efficace *in vivo*. Le domaine de l'imagerie moléculaire étant encore jeune, il est normal que les balises séparant une étude complète et une étude préliminaire soient encore mal établies. Le lecteur devrait aussi prendre en compte l'année de

publication de chaque étude – et s’attendre à ce que les études récentes soient plus robustes. Afin de faciliter le suivi de nombreuses publications, un tableau est fourni pour chaque modalité d’imagerie.

Tableau 1. Imagerie TEP et TEM des MMPs

An	Mois	Composé	Auteurs	Localisation	Cible	Type	Modalité	<i>in vivo</i>
2002	1	[¹¹ C]methyl-CGS 27023A	Fei <i>et al.</i> (2002) [Hutchins]	Indiana University	Large Spectre	AI	TEP	Non
2002	6	SAV03	Furumoto <i>et al.</i> (2002) [Ido]	Tohoku University	Large Spectre	AI	TEP	Non
2002	6	[¹¹ C]methyl-CGS 27023A	Zheng <i>et al.</i> (2002a) [Hutchins]	Indiana University	Large Spectre	AI	TEP	Non
2003	1	SAV03	Furumoto <i>et al.</i> (2003) [Ido]	Tohoku University	Large Spectre	AI	TEP	Oui
2003	3	[¹¹ C]CGS 27023 and 25966	Fei <i>et al.</i> (2003) [Hutchins]	Indiana University	Large Spectre	AI	TEP	Non
2003	5	[¹¹ C]FMAME	Zheng <i>et al.</i> (2003b) [Hutchins]	Indiana University	Large Spectre	AI	TEP	Oui
2003	10	[¹¹ C]BPSAH	Fei <i>et al.</i> (2003) [Hutchins]	Indiana University	Large Spectre	AI	TEP	Non
2004	1	[¹¹ C]MSMA	Zheng <i>et al.</i> (2004) [Hutchins]	Indiana University	Large Spectre	AI	TEP	Oui
2004	5	[¹¹ C]BPSAH (Try based)	Oltentfreiter <i>et al.</i> (2004) [Oltentfreiter]	Ghent University	MMP-2,-9,-MT1,-MT3	AI	TEM	Oui
2004	5	[¹²³ I]CGS 27023A	Schäfers <i>et al.</i> (2004) [Kopka, Breyholz]	Westfälische Wilhelms Uni.	Large Spectre	AI	TEM	Oui
2004	7	[¹¹ C]CGS 27023A	Kopka <i>et al.</i> (2004) [Kopka, Breyholz, Schäfers]	Westfälische Wilhelms Uni.	Large Spectre	AI	TEM	Oui
2005	1	[^{99m} Tc]CTT	Medina <i>et al.</i> (2005) [Koivunen]	University of Helsinki	MMP-2/-9	AI	Gamma (2D)	Oui
2005	7	[¹¹¹ I]JRP782 et [^{99m} Tc]JRP805	Su <i>et al.</i> (2005) [Sadeghi]	Yale University	Large Spectre	AI	TEM/TEP	Oui
2005	12	[¹¹ C]BPSAH (Try)	Oltentfreiter <i>et al.</i> (2005) [Oltentfreiter]	Ghent University	Large Spectre	AI	TEM	Oui
2006	1	[¹¹ C]BPSAH (Val)	Oltentfreiter <i>et al.</i> (2006) [Oltentfreiter]	Ghent University	Large Spectre	AI	TEM	Oui
2007	3	[¹⁸ F]CGS 25966/27023A	Breyholz <i>et al.</i> (2007) [Schäfers, Kopka]	University Hospital Münster	Large Spectre	AI	TEP	Non
2007	7	[¹⁸ F]CGS 25966/27023A	Wagner <i>et al.</i> (2007) [Breyholz, Schäfers, Kopka]	Westfälische Wilhelms Uni.	Large Spectre	AI	TEP	Oui
2008	8	[^{99m} Tc]JRP805	Fujimoto <i>et al.</i> (2008) [Narula]	University of California, Irvine School Of Medicine	Large Spectre	AI	TEM	Oui
2008	10	[¹¹¹ I]JRP782	Zhang <i>et al.</i> (2008) [Sadeghi]	Yale University	Large Spectre	AI	TEM	Oui
2009	1	[^{99m} Tc]CPP	Watkins <i>et al.</i> (2009) [Franc]	University of California, Irvine School Of Medicine	MMP-14	CPP	TEM	Non
2009	4	[^{99m} Tc]JRP805	Oshima <i>et al.</i> (2009) [Narula]	University of California, Irvine School Of Medicine	Large Spectre	AI	TEM	Oui
2009	5	[^{99m} Tc]Ab	Temma <i>et al.</i> (2009) [Saji]	Kyoto University	MMP-14	Ab	TEP/TEM	Oui
2009	9	[^{99m} Tc]JRP805	Haider <i>et al.</i> (2009) [Narula]	University of California	Large Spectre	AI	TEM	Oui
2010	5	[^{99m} Tc]JRP782	Razavian <i>et al.</i> (2010) [Sadeghi]	Yale University	Large Spectre	AI	TEM	Oui
2010	8	[⁶⁸ Ga]DOTA-TCTP	Ujula <i>et al.</i> (2010) [Roivainen]	University of Turku	MMP-9	AI	TEP	Oui
2010	9	[¹¹¹ I]Biotin + Ab-Strep.	Sano <i>et al.</i> (2009) [Saji]	Kyoto University	MMP-14	Ab	TEM	Oui
2010	10	ArB[¹⁸ F] ₃ Marimastat	auf dem Keller <i>et al.</i> (2010) [Overall]	University of British Columbia	Large Spectre	AI	TEP	Oui
2010	11	[^{99m} Tc]JRP805	Tekabe <i>et al.</i> (2010) [Johnson]	Columbia University	Large Spectre	AI	Radio. (2D)	Oui
2010	11	[^{99m} Tc]JRP805	Oshima <i>et al.</i> (2010) [Narula]	University of California, Irvine School Of Medicine	Large Spectre	AI	TEM	Oui
2011	10	[^{99m} Tc]JRP805	Tavakoli <i>et al.</i> (2010) [Sadeghi]	Yale University	Large Spectre	AI	TEM	Oui

Tableau 2. Imagerie optique des MMPs

An	Mois	Composé	Auteurs	Localisation	Cible	Type	Modalité	<i>in vivo</i>
2001	11	[FITC]-GPLGVNGL-poly-Lys	Bremer <i>et al.</i> (2001) [Weissleder, Tung]	CMIR, MGH	MMP-2	FPF	Optique	Oui
2004	2	PB-M7vis [FITC/Rho]	McIntyre <i>et al.</i> (2004) [Matrisian]	Vanderbilt University	MMP-7	FPF	Optique	Oui
2004	5	[Cy5.5]-GVPLSLTMGC- {NIRQ820}f	Pham <i>et al.</i> (2004) [Weissleder/Tung]	CMIR, MGH	MMP-7	FPQ	Optique	Non
2005	4	[Cy5.5]-GGPRQITAGK-poly- Lys	Chen <i>et al.</i> (2005) [Weissleder, Tung]	CMIR, MGH	MMP-2,-9	FPF	Optique	Oui
2006	7	[Cy5.5]-GGPRQITAG-poly- Lysine	Deguchi <i>et al.</i> (2006) [Weissleder, Tung, Libby]	CMIR, MGH	MMP-2,-9	FPF	Optique	Oui
2006	9	QD-CPP	Zhang <i>et al.</i> (2006) [Rao]	Stanford University	MMP-2/-7	CPP	Optique	Non
2007	7	TF-M(VPLSLYSYG)-ApoB- [GFP]	Suzuki <i>et al.</i> (2007) [Umezawa]	University of Tokyo	MMP-9	CPP		Non
2007	7	MMPsense 680	Alencar <i>et al.</i> (2007) [Weissleder, Mahmood]	CMIR, MGH	Large Spectre	FPF	Optique	Oui
2008	2	[Cy5.5]Barbiturique	Faust <i>et al.</i> (2008) [Breyholz, Wagner, Kopka, Schäfers, Bremer]	University of Münster	MMP2	AI	Optique	Non
2008	5	PB-M7NIR [Cy5.5/AF750]	Scherer <i>et al.</i> (2008) [McIntyre, Matrisian]	Vanderbilt University	MMP-7	FPF	Optique	Oui
2008	7	[Cy5.5]-GPLGMNGLGL- {BHQ-3}	Lee <i>et al.</i> (2008) [Choi, Kim]	Korea Institute of Science and Technology	MMP-13	FPQ	Optique	Oui
2009	3	[Cy5.5]CGS27023A et [Cy5.5]CGS25966	Faust <i>et al.</i> (2009) [Breyholz, Wagner, Kopka, Schäfers, Bremer]	University of Münster	Large Spectre	AI	Optique	Non
2009	3	MMPsense 680	Baeten <i>et al.</i> (2009) [Ntziachristos]	Technische Univeristät München	Large Spectre	FPF	Optique	Oui
2009	5	Peptide cyclique HWGF- [Cy5.5]	Wang <i>et al.</i> (2009) [Li]	University of Texas	MMP-2	AI	Optique	Oui
2009	5	MMPsense 680	Klohs <i>et al.</i> (2009) [Wunder]	Charité University Medicine Berlin	Large Spectre	FPF	Optique	Oui
2009	5.26	MMPsense 680	Wallis deVries <i>et al.</i> (2009) [Zeebregts]	University of Groningen	Large Spectre	FPF	Optique	Oui
2009	6	ACPP-Cy5	Olson <i>et al.</i> (2009) [Tsien]	Univ. of California at San Diego	MMP-2, -9 et -14	CPP	Optique	Oui
2009	6	ACPP-Cy5	Aguilera <i>et al.</i> (2009) [Tsien]	Univ. of California at San Diego	MMP-2, -9 et -14	CPP	Optique	Oui
2010	1	ApoB-GPLGPRS-TM- [DsRed2]	Zhao <i>et al.</i> (2010) [Iwata, Saji, Hiraoka]	4th Military Medical University	MMP-2 et -14	Autre	Optique	Oui
2010	3	ACPP-dendrimer-Cy5	Olson <i>et al.</i> (2009) [Tsien]	Univ. of California at San Diego	MMP-2, -9 et -14	CPP	Optique	Oui
2010	3	ACPP-dendrimer-Cy5	Nelson <i>et al.</i> (2009) [Tsien]	Univ. of California at San Diego	MMP-2, -9 et -14	CPP	Optique/IRM	Oui
2010	5	MMPsense 680	Sheth <i>et al.</i> (2010) [Mahmood]	NMMI, MGH	Large Spectre	FPF	Optique	Oui
2010	9	[Cy5.5]-GVPLSLTMGKGG- {BHQ-3}	Ryu <i>et al.</i> (2010) [Choi, Kim]	Korea Inst. of Sci. and Techn.	MMP-13	FPQ	Optique	Oui
2010	10	[Cy5.5]Nanotube d'or	Kee Yi <i>et al.</i> (2010) [Ahn]	Kyungwon University (Korea)		Autre	Optique	
2011	1	MT1-AF7p [Cy5.5]	Chen <i>et al.</i> (2011) [Chen]	LOMIN (NIH)/University of Jilin	MT1-MMP	Autre	Optique	Oui
2011	3	MMPsense 750	Evans <i>et al.</i> (2011) [Nowell]	Cardiff University	Large Spectre	FPF	Optique	Oui
2011	5	MMPsense 680	Yoon <i>et al.</i> (2011) [Kim]	Chungbuk National University	Large Spectre	FPF	Optique	Oui
2011	8	MMPsense 680	Clapper <i>et al.</i> (2011) [Cooper]	Fox Chase Cancer Center	Large Spectre	FPF	Optique	Oui

Tableau 3. Imagerie par résonance magnétique des MMPs

An	Mois	Composé	Auteurs	Localisation	Cible	Type	Modalité	<i>in vivo</i>
2007	11	PCA7-switch	Lepage et al. (2007) [McIntyre, Matrisian]	Vanderbilt University	MMP-7	CdS	IRM	Oui
2008	2	P947-(DOTA-Gd)	Lancelot et al. (2008) [Fayad]	Mt. Sinai School of Med.	Large Spectre	AI	IRM	Oui
2009	5	P947-(DOTA-Gd)	Amirbekian et al. (2009) [Fayad]	Mt. Sinai School of Med.	Large Spectre	AI	IRM	Oui
2010	10	P947-(DOTA-Gd)	Bazeli et al. (2010) [Serfaty]	Uni. Paris 7	Large Spectre	AI	IRM	Oui
2010	11	P947-(DOTA-Gd)	Hyafil et al. (2010) [Fayad]	Mt. Sinai School of Med.	Large Spectre	AI	IRM	Oui
2010	12	Ab-Strep. Biot.-PAMAM-Gd	Sano et al. (2010) [Saji]	Kyoto University	MT1-MMP	Ab	IRM	Oui

Auteurs : En plus de l'auteur principal, les investigateurs revenant dans plusieurs autres publications sont mentionnés entre crochets.

Type : Principe sur lequel la sonde est basée.

In vivo : Indique si la sonde a été testée dans un modèle animal.

AI : Analogue d'inhibiteur

CPP : Peptide de pénétration cellulaire

FPF : Fluorophore-peptide-fluorophore, soit une sonde basée sur l'auto-atténuation de ses fluorophores

FPQ : Fluorophore-peptide-quencher, soit une sonde basée sur l'atténuation de sa fluorescence par un groupement non fluorescent

Uni. : Université

1.3.1 Radiotraceurs pour la TEP et la TEM

1.3.1.1 CGS 27023, CGS 25966, FMAME et MSMA marqués au [¹¹C] ou au [¹⁸F]

En 2001, les premiers traceurs TEP ciblant les MMPs ont été synthétisés (Zheng *et al.*, 2001). Deux analogues de CGS 27023A marqués au [¹¹C] et au [¹⁸F] ont initialement été testés *in vitro* contre la MMP-1. Malgré leur affinité pour cette dernière, les faibles rendements de leur synthèse a rendu ces composés inadéquats et ne justifie pas d'investigations plus poussées. L'équipe se tourne alors vers une longue série de dérivés de type CGS 27023. Voici une liste des plus importants :

- [¹¹C]methyl-CGS 27023A (Fei *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2002)
- [¹¹C]FMAME (Zheng *et al.*, 2003) (Fig. 7)
- [¹¹C]CGS 25966 (Fei *et al.*, 2003) (Fig. 8)
- [¹¹C]MSMA (Zheng *et al.*, 2004) (Fig. 8)
- Dérivés biphenylsulphonamides hydroxamate (Fei *et al.*, 2003)

Ces molécules (non marquées) étaient déjà connues dans la littérature pour leur forte inhibition de plusieurs MMPs. Dans certains cas, les auteurs effectuent une confirmation de l'inhibition de la MMP-1 ou de la MMP-13 par les molécules marquées – contrôle classique pour vérifier la bonne liaison de ces molécules à leurs cibles. Les agents [¹¹C]MSMA, [¹¹C]FMAME et [¹¹C]CGS 25966 sont testés *in vivo* dans un modèle de souris athymiques avec des tumeurs sous-cutanées MCF-7. Malgré l'affinité apparente des composés pour les MMPs, leur biodistribution s'est révélée décevante avec un ratio tumeur/muscle < 1.5. L'imagerie TEP avec [¹¹C] FMAME (Fig. 8) a montré que ce traceur s'accumule dans les tumeurs, mais l'échec des essais de compétition avec le ligand froid a forcé les auteurs à conclure que cette localisation était due à des phénomènes non spécifiques, et non à la liaison de la sonde aux MMPs ciblées. Les deux autres traceurs n'ont pas permis d'observer les tumeurs MCF-7 *in vivo* (Fig 9). Après 2004, soit trois années d'investigation, le groupe de Hutchins a abandonné l'imagerie des MMPs en concluant que même les inhibiteurs les plus efficaces ne sont pas nécessairement de bons candidats pour le développement de radiotraceurs pour l'imagerie TEP.

Figure 7. [^{11}C]FMAME : Structure et résultats *in vivo*

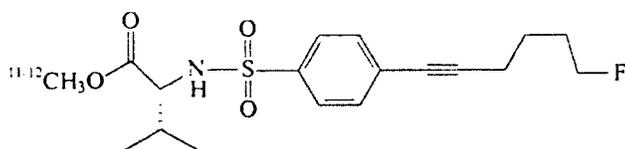


Figure incluse avec permission. Zheng, Qi-Huang *et al.* Nuclear medicine and biology (2003) 30(7) p.753
© Elsevier Inc

Structure du composé [^{11}C]FMAME et imagerie d'une souris athymique portant une tumeur MCF-7 (flèche) 45 minutes après injection (Zheng *et al.*, 2003).

1.3.1.2 SAV03 et SAV03M marqués au [^{18}F]

En 2002, une équipe japonaise tente de développer un traceur TEP spécifique à la MMP-2. La structure d'un inhibiteur voulu « spécifique » et déjà publiée est utilisée pour la conception et la synthèse d'un composé nommé [^{18}F]SAV03 (Fig. 9) (Furumoto *et al.*, 2002). Ce traceur, ainsi qu'un dérivé méthylé [^{18}F]SAV03M correspondant à un précurseur métabolique, sont évalués *in vivo* dans un modèle murin (souris ddy) de tumeurs Ehrlich sous-cutanées (cancer mammaire) (Furumoto *et al.*, 2003). Un essai d'inhibition montre que le composé SAV03 est un inhibiteur peu efficace de la MMP-2 (concentration nécessaire pour obtenir 50% d'inhibition (IC_{50}) = 1600 nM), et aucune évaluation de sa spécificité par rapport aux autres MMPs n'est effectuée. Les auteurs montrent que bien que [^{18}F]SAV03 soit excrété rapidement par le foie, [^{18}F]SAV03M est éliminé moins rapidement et est graduellement dégradé en [^{18}F]SAV03, permettant de contrer l'élimination trop rapide de ce dernier.

Le prélèvement des organes 120 minutes post-injection démontre que le traceur [^{18}F]SAV03 a une biodistribution peu favorable à l'imagerie avec une accumulation marquée dans les os (7.3% ID/g), dans l'intestin (2.6% ID/g) et le foie (1.3% ID/g). L'accumulation dans les tumeurs est marginale (0.22% ID/g), mais le ratio tumeur/muscle est tout de même appréciable (8.42). Les auteurs concluent que le composé est inadéquat pour l'imagerie. Ce type de biodistribution pourrait indiquer que le marquage au ^{18}F est

instable et que le fluor se dissocie avant de s'accumuler dans les os. Toutefois les auteurs n'ont pas investigué cette possibilité. Aucune publication ne reprend les travaux effectués avec ces composés.

Figure 8. Structures de [^{11}C]MSMA et [^{11}C]CGS 25966 et imagerie TEP

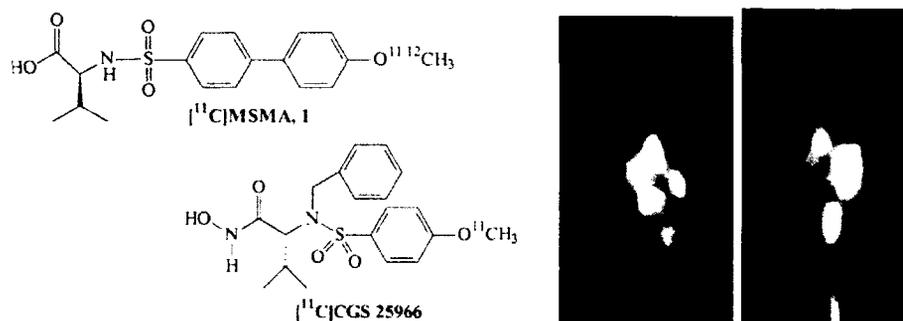


Figure incluse avec permission. Zheng, Qi-Huang *et al.* Nuclear medicine and biology (2004) 31(1) p.77
© Elsevier Inc

Structure des composés [^{11}C]MSMA et [^{11}C]CGS 25966 et images correspondantes de souris athymiques portant des tumeurs MCF-7. Les tumeurs ne sont pas visibles et les sondes se retrouvent dans les tissus d'excrétion.

Figure 8. Structure de [^{18}F]SAV03 et autoradiographie

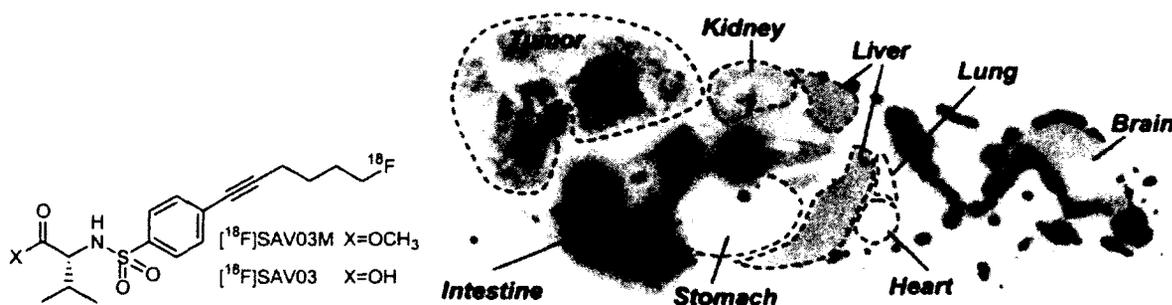


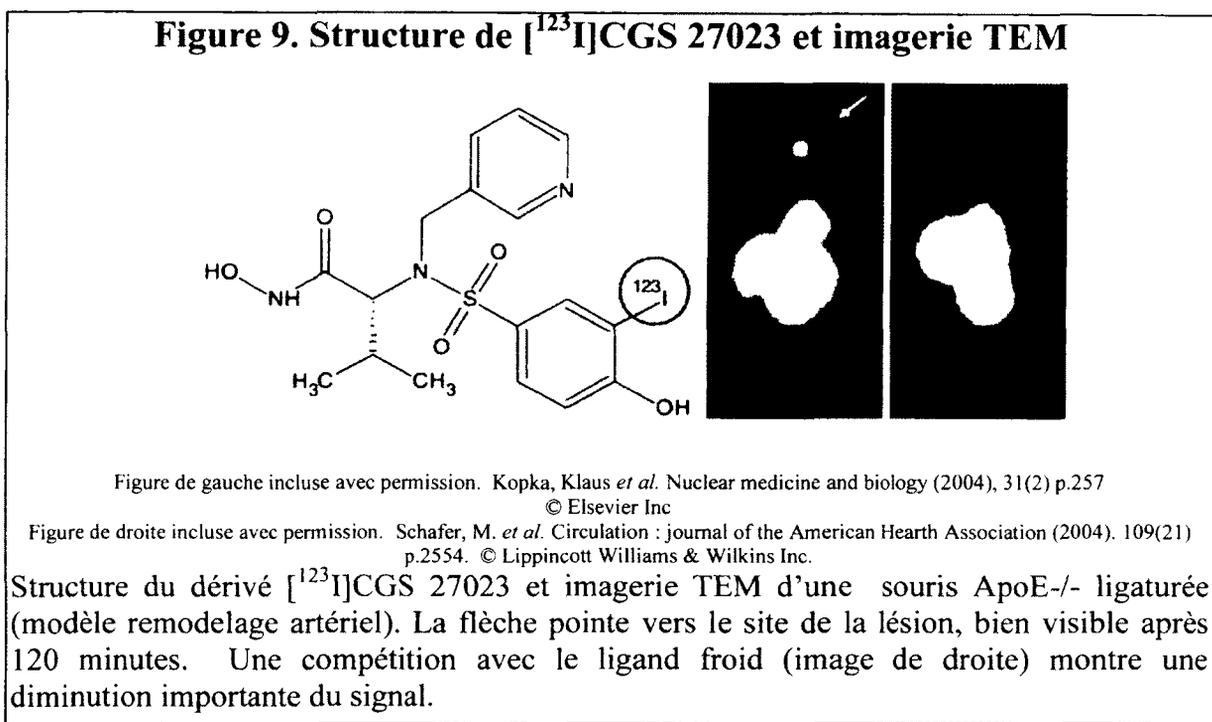
Figure incluse avec permission. Furomoto, Shozo *et al.* Nuclear medicine and biology (2003) 30(2) p.119
© Elsevier Inc

Structure des composés [^{18}F]SVA03 et 03M et autoradiographie des organes d'une souris ddy portant une tumeur Ehrlich, 120 minutes après injection I.V. de [^{18}F]SVA03M.

1.3.1.3 CGS 27023A marqué au [^{123}I]

Les résultats décevants avec les dérivés méthylés de l'inhibiteur CGS 27023A publiés par le groupe de Hutchins n'ont pas empêché le groupe de Klaus Kopka et Michael Schäfers (Westfälische Wilhelms University, Münster, Allemagne) de marquer plusieurs dérivés de

cette molécule avec le radio-isotope [^{111}I] (Kopka *et al.*, 2004) pour l'imagerie TEM des MMPs. L'excellente affinité de la molécule de base pour les MMP-2 et -9 (IC_{50} 11.2 nM et 59.6 nM) a même été améliorée pour l'un des dérivés préparés, augurant bien pour les expériences d'imagerie (Composé 1c, IC_{50} de 2.5 et 4.6 nM). Une biodistribution a montré que la sonde s'accumulait dans plusieurs organes exprimant de hauts niveaux de MMPs (poumons, cœur, tissus adipeux), mais beaucoup plus fortement dans les organes d'excrétion (rein et foie).



Les auteurs concluent que la molécule serait un excellent candidat pour l'imagerie scintigraphique de l'activité des MMPs, et conséquemment publie l'étude de son évaluation dans un modèle de remodelage artériel chez la souris ApoE $^{-/-}$ (Schafers *et al.*, 2004). Un signal spécifique et pouvant être bloqué par compétition est obtenu (Fig. 10). Cette sonde est toutefois reléguée aux oubliettes par le groupe, qui développe par la suite des sondes moins intéressantes décrites ci-après.

1.3.1.4 CGS 27023A et CGS 25966 marqués au [^{18}F]

Le même groupe poursuit ses recherches avec plusieurs dérivés [^{18}F] des inhibiteurs CGS 25966 et CGS 27023A (Breyholz *et al.*, 2007; Wagner *et al.*, 2007) (Fig. 11), un isotope adapté à l'imagerie TEP. Malgré un potentiel inhibiteur élevé pour les MMPs 2, 8, 9 et 13

($IC_{50} < 10$ nM), les auteurs n'ont pas décelé de liaison spécifique à la cible avec des essais de compétition (ligand froid), contrairement à l'étude précédente (Schäfers *et al.* (2004). La biodistribution (Fig. 11) n'a pas montré de captation élevée dans les tissus reconnus pour avoir des niveaux élevés de MMPs.

Figure 10. Structure et biodistribution de [^{18}F]CGS 27023

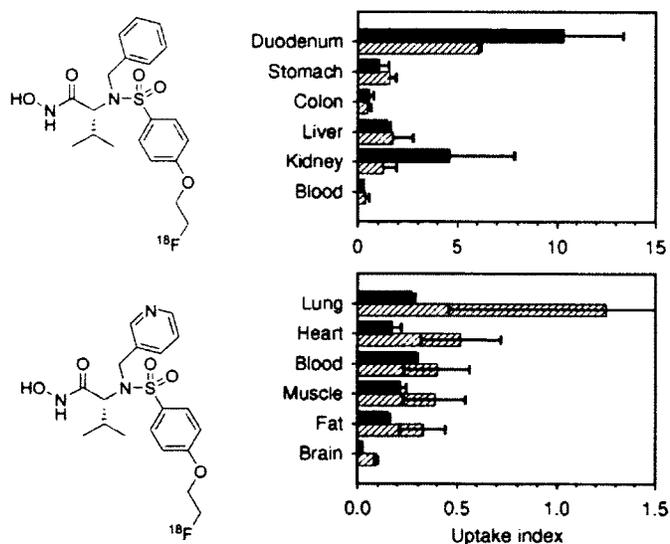


Figure incluse avec permission. Stephan Wagner *et al.* Journal of medicinal chemistry (2007), 50(23)

© American Chemical Society

Structure de deux dérivés [^{18}F]CGS 27023 (1f et 1j) et leur biodistribution (1f – barres pleines, 1j – barres rayées) dans les organes excréteurs (haut) et les organes reconnus comme exprimant de hauts niveaux de MMP-2 (bas). Notez la différence d'échelle entre les deux graphiques.

Finalement, la stabilité des deux dérivés les plus prometteurs est faible (<53% après 20 minutes). Malgré ces résultats, les auteurs soutiennent tout de même le potentiel de ces candidats pour l'imagerie de MMPs *in vivo* – une étrange dégringolade après avoir publié une première étude montrant des résultats prometteurs avec le traceur [^{123}I]-CGS 27023A.

1.3.1.5 Biphénylesulphonamides marqués au [^{111}I]

En 2004, 2005 et 2006, Oltenfreiter et collègues (Oltenfreiter *et al.*, 2004; Oltenfreiter *et al.*, 2005; Oltenfreiter *et al.*, 2006) ont publié les résultats de synthèse et de biodistribution de composés de type biphénylesulphonamide basés sur le tryptophane (2004, 2005) et la valine (2006). La structure de ces composés leur permet d'interagir avec les groupements

chimiques autour du site actif des MMPs. Afin d'améliorer la sélectivité de ces composés, le squelette est modifié avec des chaînes latérales formant des interactions supplémentaires avec les acides aminés des sites catalytiques. Toutefois, les résultats avec ces composés se sont révélés décevants (Fig. 12).

Figure 11. Dérivés biphenylsulphamides : Structure et imagerie scintigraphique

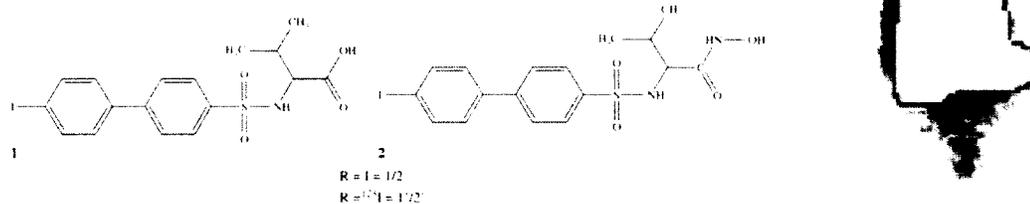


Figure incluse avec permission. Oltenfreiter, Ruth *et al.* Applied radiation and isotopes (2006). 64(6) p.677

© Elsevier Science

Structures de deux dérivés biphenylsulphamides de la valine et image de scintigraphie planaire d'une souris Swiss nu/nu avec tumeur A549 (flèche) après injection du composé "1" 24 post injection.

Entre autre, les composés basés sur les valines, avec des valeurs d' IC_{50} autour de 30 nM (MMP-2) et de 300 nM (MMP-9) n'ont pas marqué les tumeurs de manière satisfaisante. Aucun des composés présentés ne s'est accumulé dans les tumeurs de type A549 inoculées sur des souris Swiss *nu/nu* - une lignée cellulaire qui, selon les auteurs, surexprime la MMP-2 (zymographie à l'appui). La biodistribution était aussi décevante avec un fort temps de résidence dans le sang et une accumulation importante dans le foie, les intestins et les reins. Les auteurs concluent que ces composés ne sont pas adéquats pour l'imagerie.

1.3.1.11 Les peptides cycliques CTT- $[^{99m}Tc]$, CTT- $[^{125}I]$ et TCTP-1-DOTA $[^{67}Ga]$

L'utilisation d'une librairie de peptide a permis au groupe de Koivunen (Université de Helsinki, Finlande) d'isoler et de caractériser une série de peptides cycliques avec un fort potentiel de liaison et d'inhibition des gélatinases (Koivunen *et al.*, 1999). Le peptide CTTHWGFTLC, rebaptisé simplement CTT, possède une activité inhibitrice intéressante

pour les MMP-2 et -9 ($IC_{50} = 10 \mu\text{M}$ et $100 \mu\text{M}$ respectivement), et aucune activité inhibitrice pour les MMP-8 et -13, ainsi que pour la trypsin-2, l'élastase de neutrophile ou la cathepsin G. *In vivo*, ce peptide s'est révélé efficace pour ralentir la croissance tumorale et améliorer la survie de souris portant différents types de tumeurs sous-cutanées : MDA-MB-435, KS1767 (dérivées du sarcome de Kaposi) et SKOV-3 (carcinome ovarien). En 2005, l'équipe finlandaise a repris ce peptide et l'a marqué au [^{125}I] ou au [$^{99\text{m}}\text{Tc}$] (Medina *et al.*, 2005). Les peptides marqués conservent les propriétés inhibitrices du composé parent, mais les essais *in vivo* dans le modèle KS1767 ont montré que les composés ne semblaient pas adéquats pour l'imagerie à cause de l'instabilité du marquage ([^{125}I]) et de l'absence d'accumulation élevée dans les tumeurs. Les auteurs ont toutefois observé une certaine accumulation dans les poumons, qui ont tendance à présenter des taux élevés de MMPs. Par contre, aucun contrôle de la spécificité du marquage *in vivo* n'a été effectué, et les auteurs ont simplement conclu que leurs agents constituent un « point de départ » pour le développement d'une méthode d'imagerie précise des tumeurs et de leurs développements.

Une autre équipe finlandaise a isolé un second peptide cyclique (**LNSGAG**) liant la MMP-9 (Ujula *et al.*, 2010). Les auteurs ont préparé trois dérivés de ce peptide. Ils ont cyclisé une première version **I** (**GAC**LNSGNGCG-PEG₃-DOTA (acide 1,4,7,10-tetraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique) grâce à des cystéines ajoutés dans la séquence. Une seconde version **II** (**DALNSNGE**-lactam-linker-DOTA) est cyclisée avec un groupement lactame. La dernière version **III** (**GAALNSGNGAG**-PEG₃-DOTA) consistait en un contrôle linéaire. Les auteurs ont inclus un [^{68}Ga] dans le chélateur (DOTA) lié à chacun des composés. La stabilité plasmatique *ex vivo* ($DV_I = 2.5 \text{ h}$, $DV_{II} \gg 4 \text{ h}$ et $DV_{III} = 1 \text{ h}$), puis *in vivo* ($DV_I \sim DV_{II} < 1 \text{ h}$, $DV_{III} \ll 15 \text{ min}$) s'est révélée décevante. Les auteurs ont employé un modèle de xéno greffe basé sur des cellules de mélanome humain (C8161) en tumeurs sous-cutanées au niveau du cou (rats mâle HSD : RH-rnu/rnu) pour tester leurs composés *in vivo*. L'imagerie TEP après l'injection du composé **I** a montré une forte accumulation dans la vessie, les reins et le foie, et une accumulation modérée dans la tumeur et le cœur, avec un ratio de signal tumeur/muscle de 5.5 (ratios pour **II** et **III** de ~ 3) 120 minutes après injection. Les auteurs n'ont pas vérifié la

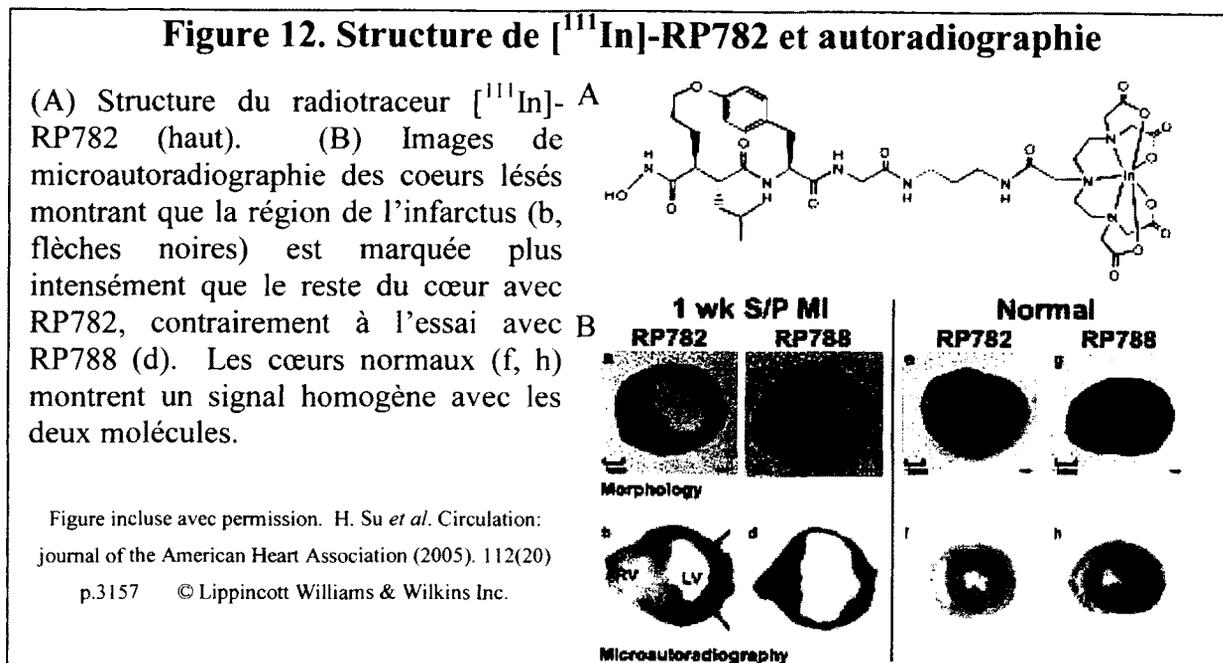
spécificité de leurs composés fonctionnalisés pour les MMPs *in vivo*. Cette étude demeure donc préliminaire.

1.3.1.6 RP782 : un inhibiteur à large spectre marqué au [¹¹¹In]

En 2005, Su *et al.* ont utilisé un peptide inhibiteur de MMP à large spectre marqué à l'indium (¹¹¹In-RP782) ou au technétium (^{99m}Tc-RP805, voir section suivante) afin de détecter les MMPs *in vivo* (Su *et al.*, 2005). Plus spécifiquement, cet inhibiteur lie le site actif des MMPs et requiert le retrait du pro-peptide pour ce faire (activation de l'enzyme). L'IC₅₀ et l'affinité de ¹¹¹In-RP782 pour les MMPs est supposée adéquate par les auteurs en se basant sur des résultats antérieurs avec des molécules similaires (Xue *et al.*, 2001), mais les auteurs n'ont pas fourni de confirmation expérimentale avec leur sonde. La structure sur laquelle RP782 repose sur celle d'une molécule commerciale (Bristol-Myers), ce qui explique pourquoi certains détails ne sont pas disponibles. Ce traceur a été testé dans un modèle de remodelage tissulaire post-infarctus (ApoE^{-/-}, lésion induite chirurgicalement), avant et une semaine après la chirurgie (lésion), et uniquement par autoradiographie. Dans ce cadre, ¹¹¹In-RP782 a permis de détecter la région de l'infarctus (>300% d'augmentation du signal vs une région saine), contrairement à la molécule contrôle (un énantiomère non spécifique ¹¹¹In-RP788, dont le signal était identique dans les deux régions) (Fig. 13). Ces résultats sont supportés par la quantification du traceur dans les tissus disséqués et dosés à l'aide d'un compteur gamma. Toutefois, aucun contrôle de compétition n'a été effectué et l'identité des cibles n'a pas été confirmée, bien que des zymographies aient confirmé la présence de MMP-2 et MMP-9 activées dans la région de l'infarctus.

En 2008, ¹¹¹In-RP782 est utilisé dans un modèle murin de remodelage vasculaire (souris ApoE^{-/-}, lésion induite chirurgicalement) afin de détecter les MMPs actives sur un site au niveau d'une artère carotidienne (Zhang *et al.*, 2008). Pour cette seconde étude, les auteurs ont effectué deux expériences contrôle de compétition, premièrement avec le ligand froid (prétraitement à 50x) et deuxièmement avec un inhibiteur de MMP à large spectre (1,10-phénantroline). Les deux contrôles ont démontré la spécificité du marquage pour les MMPs (par autoradiographie). Toutefois, les auteurs n'ont pas présenté d'images *in vivo* des essais de compétition. Les images *ex vivo* ont montré une réduction de l'ensemble du marquage, et non seulement au niveau de la lésion, ce qui indiquerait que des MMPs étaient

présentes partout – toutefois, une analyse en profondeur sur le ratio tissu sain/lésé avec les sondes test/contrôle (ctrl) aurait permis de mieux apprécier le contraste réel induit par le signal spécifique.



Razavian *et al.* (2010) ont utilisé RP782 (et RP805) afin de quantifier les MMPs actives *in vivo* dans un modèle d'anévrisme de la carotide chez la souris. Les auteurs ont corrélé leurs résultats d'imagerie avec un essai de l'activité enzymatique dans les tissus *ex vivo*. Un contrôle avec un excès de ligand froid a été effectué et a réduit le signal observé par 50%, indiquant la proportion de signal spécifique. Cette fois, les auteurs ont présenté des images *in vivo* de l'essai de compétition, mais l'échelle d'intensité rend impossible l'évaluation de l'impact de la compétition sur les régions saines de l'animal.

En conclusion, cet agent semble prometteur pour détecter l'ensemble du spectre des MMPs, mais il aurait été très intéressant de pouvoir mieux comparer les essais de compétition avec les essais de la sonde seule afin de pouvoir apprécier la distribution du signal spécifique. Une corrélation de ce signal avec les quantités d'enzyme active dans les tissus aurait aussi été probante de l'efficacité de la sonde.

1.3.1.7 RP805 : un inhibiteur à large spectre marqué au [^{99m}Tc]

En parallèle avec RP782, le RP805 est utilisé par Su et collègues dans le modèle d'infarctus myocardique décrit à la dernière section (Su *et al.*, 2005). Des essais d'inhibition ont permis de déterminer l'IC₅₀ du [^{99m}Tc]-RP805 pour les MMP-2 (10.5 nM), -3 (14 nM), -7 (<6.4 nM), -12 (<6 nM) et -13 (7.3 nM). La pharmacocinétique de ^{99m}Tc -RP805 se trouve à être favorable à l'imagerie avec une élimination rapide par les reins (~13 minutes de demi-vie biologique, l'imagerie était effectuée 90 minutes post-injection). Le traceur a été utilisé avec succès pour obtenir des images TEM probantes du cœur de souris dans le modèle d'infarctus myocardique (Fig. 14). La perfusion cardiaque des régions contrôles et lésées est contrôlée par l'injection de ^{201}Tl . Le radio-isotope ^{201}Tl est normalement utilisé en tant que marqueur de la viabilité et de la perfusion cardiaque. Les auteurs ont mesuré une quantité de ^{201}Tl plus faible dans la région lésée après la chirurgie (tel que prévu). Sur les images TEM effectuées avec le RP805 (Fig. 14), les reins et la rate sont clairement visibles, mais la région d'infarctus cardiaque est aussi marquée de manière intense. Ceci est d'autant plus étonnant vu la faible perfusion de cette région, tel que déterminée avec le ^{201}Tl . Il aurait été intéressant d'effectuer un contrôle en présence d'un inhibiteur de MMP à large spectre afin de permettre d'apprécier la proportion de signal spécifique par TEM. Ces résultats demeurent toutefois probants.

Dans une étude subséquente avec le RP805, Fujimoto *et al.* (2008) ont étudié la production des MMPs dans un modèle d'athérosclérose chez le lapin (Fig. 14C), avec ou sans traitement (fluvastatine) et avec ou sans diète riche en cholestérol. L'accumulation du traceur au niveau des plaques (TEM *in vivo* et *ex vivo*) a été corrélée à l'expression de la MMP-9 dans tous les groupes, et avec l'expression de la MMP-2 dans tous les groupes sauf le groupe fluvastatine. Une compétition avec un ligand froid a montré que ~700 nmoles injectées dans un lapin de ~3 kg permettaient de bloquer 60% du signal (Fujimoto *et al.*, 2008), ce qui une fois de plus nous indique la proportion de signal spécifique.

En 2009, le RP805 est employé dans deux modèles murins de formation de plaques d'athérosclérose (ApoE^{-/-} et LDLR^{-/-}, associés ou non à une diète riche en gras) (Ohshima *et al.*, 2009). Le radiotracer a permis de détecter l'emplacement des plaques (arche aortique et les vaisseaux prédominant de l'aorte abdominale). Le niveau de captation (%ID/g)

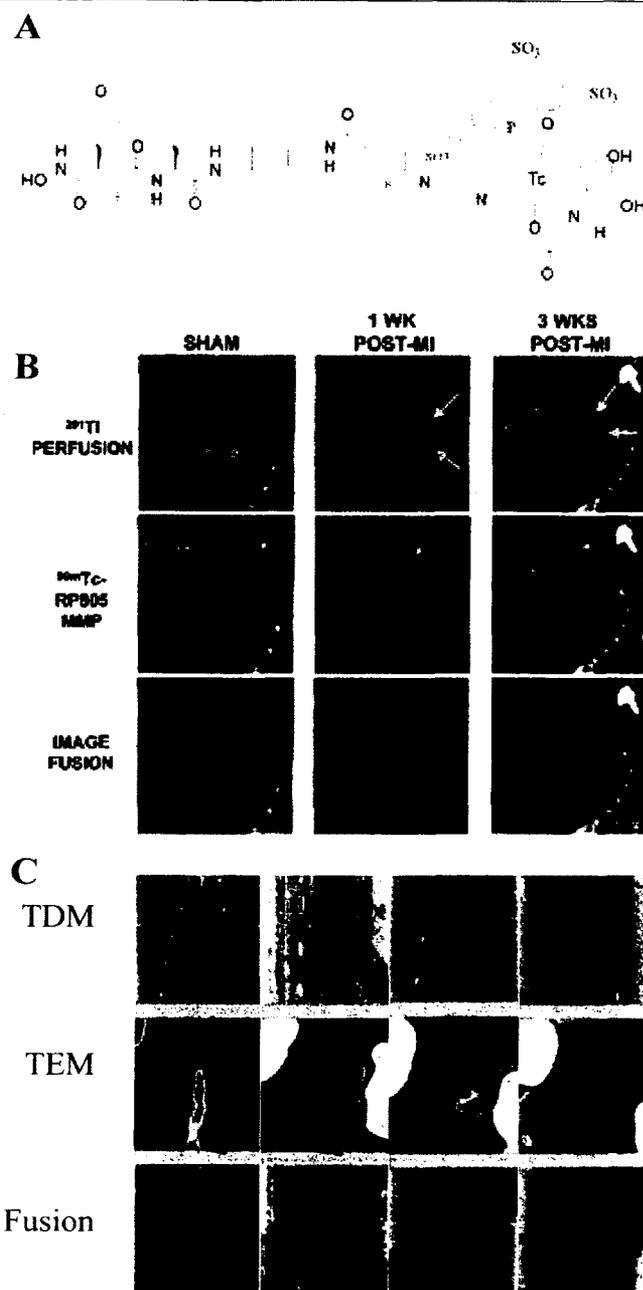
déterminé *ex vivo* (compteur gamma) a pu être corrélé avec les marquages histochimiques des MMP-2 et -9 ($r = 0.65$ et 0.62 et $p < 0.01$ et 0.01 respectivement). Toutefois, les auteurs n'ont pas discuté de la corrélation entre l'intensité du marquage en imagerie TEM et les marquages immunohistochimiques.

Figure 13. Structure de [^{99m}Tc]-RP805 et imagerie TEM/TDM

(A) La structure du traceur [^{99m}Tc]-RP805. (B) L'imagerie TEM/TDM avec le [^{201}Ti] est utilisé pour démontrer la perfusion cardiaque. Le RP805 s'accumule dans la région de l'infarctus (entre les flèches jaunes). La flèche blanche pointillée indique l'endroit où l'abdomen a été ouvert pour procéder à la préparation de l'animal pour l'induction de l'infarctus. (C) Dans un modèle d'athérosclérose (lapin), le RP805 marque les plaques au niveau de l'aorte (i), mais un traitement (ii) ou un retour à une diète normale (iii) permet de retrouver un signal proche des animaux contrôles (iv). Les flèches noires dans les images indiquent l'aorte.

Figure A et B incluses avec permission. H. Su et al. *Circulation* : journal of the American Heart Association (2005). 112(20) p.3157
© Lippincott Williams & Wilkins

Figure C incluse avec permission. Fujimoto, Shinichiro et al. *Journal of the American College of Cardiology* (2008). 52(21) p.1847
© Elsevier Inc.



Dans une autre étude, le même groupe a utilisé le RP805 pour déterminer l'impact d'un traitement antibactérien sur l'évolution des plaques athérosclérotiques chez le lapin. Ils ont

obtenu des résultats similaires (corrélation entre l'évolution des plaques, l'activité des MMP-2 et MMP-9 et le signal %ID/g détecté par TEM).

En 2009 et 2010, le ^{99m}Tc -RP805 a été utilisé pour le diagnostic de l'athérosclérose à l'aide des MMPs comme biomarqueur dans un modèle de souris ApoE^{-/-} avec diète riche en gras. L'étude de l'activité des MMPs a été effectuée en parallèle avec la quantification d'un deuxième marqueur : la phosphatidylsérine. Cette dernière devient accessible à l'extérieur de la membrane cellulaire au cours de l'apoptose, et peut être marquée grâce au traceur [^{99m}Tc]-Annexine V (l'annexine lie la phosphatidylsérine) (Haider *et al.*, 2009; Tekabe *et al.*, 2010). À noter que ces études ont été effectuées sur un imageur planaire (2D) et non un imageur TEM/TDM (3D), et sont de piètre qualité. Après 20 semaines de diète, l'annexine V s'accumulait davantage que RP805. Cette tendance s'inversait à 40 semaines, principalement en raison d'une diminution significative du marquage à l'annexine (peu de différence au niveau des MMPs). Les auteurs ont toutefois détecté une augmentation significative ($P < 0.01$) de la présence des MMP-2 et -9 (cibles de RP805), et une diminution non significative de la caspase-3 par immunohistochimie (marquage à l'aide d'anticorps). L'intensité des phénomènes (augmentation MMP, diminution apoptose) observée par imagerie ne correspond donc pas parfaitement avec les résultats d'immunohistochimie. De plus, les auteurs n'ont pas utilisé les images, mais bien les organes disséqués, afin d'effectuer leur quantification des marquages et la corrélation avec l'immunohistochimie – et la qualité des images soulève des doutes sur l'efficacité du traceur pour l'imagerie.

Finalement, en 2011, ^{99m}Tc -RP805 a été utilisé pour étudier l'impact d'une amélioration diététique (Tavakoli *et al.*, 2011) (même modèle que pour Zhang *et al.* (2008)). Des différences significatives de signal ont été détectées entre les artères lésées et non lésées, mais aussi entre les groupes à diète normale ou riche en gras. Ces résultats ont une fois de plus été corrélés par immunohistochimie.

En conclusion, ^{99m}Tc -RP805 est un agent qui a été utilisé dans une série de publication entre 2005 et 2011, utilisant divers modèles murins et du lapin (infarctus et athérosclérose). Ce traceur est capté fortement dans les zones contenant des concentrations élevées de MMPs. La liaison de ^{99m}Tc -RP805 est spécifique et peut être réduite grâce à une compétition avec un ligand froid, mais une proportion importante du signal est non

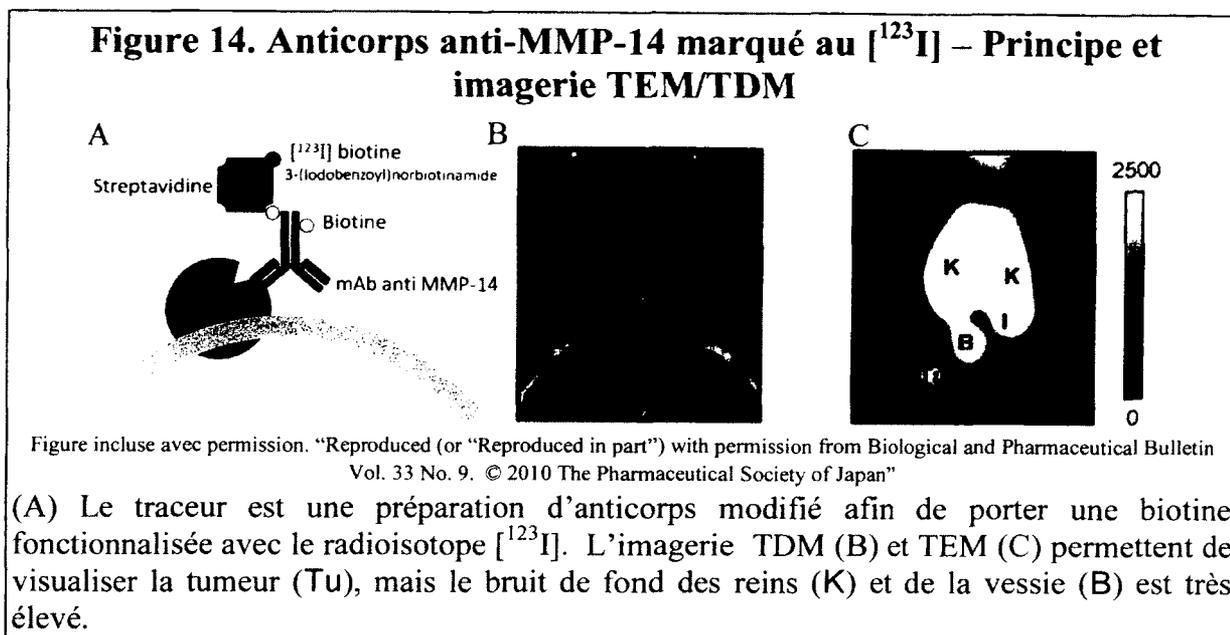
spécifique (40-50% selon les études). La principale limitation des essais est la nature exacte de ses cibles, qui reste à être déterminée, car la corrélation entre les niveaux de MMPs testées (MMP-2 et MMP-9) et l'intensité de captation de ce traceur restent faibles ($r < 0.70$), même si significatives. D'autres molécules cibles pourraient donc être impliquées – mais l'ensemble des résultats est cohérent et prometteur.

1.3.1.8 Anticorps anti-MMP-14 marqué au [^{99m}Tc]/[^{123}I]

En 2009 et 2010, l'équipe japonaise de Hideo Saji a publié coup sur coup deux articles portant sur la détection immunologique de la MMP-14 (MT-MMP-1) à l'aide d'un anticorps monoclonal marqué au ^{99m}Tc (Temma *et al.*, 2009) ou au [^{123}I] (Sano *et al.*, 2010). Les stratégies d'attachement du radioisotope à l'anticorps diffèrent entre les études :

- Temma *et al.* (2009) ont fonctionnalisé l'anticorps à l'aide d'hydrazinonicotinamide (HYNIC), et d'une incubation avec du ^{99m}Tc -(tricine)₂ avec laquelle un complexe stable (^{99m}Tc -anti-MMP-14) est obtenu.
- Sano *et al.* (2010) ont fonctionnalisé l'anticorps avec des groupements biotine (covalent) (Fig. 15). L'anticorps est incubé avec de la streptavidine (4 sites de liaison pour la biotine) et forme un complexe non covalent mais stable. Des molécules de biotine fonctionnalisées avec du [^{123}I] sont incubées avec l'anticorps-biotine-streptavidine pour donner le radiotracer final.

Temma *et al.* (2009) ont confirmé l'affinité de leur agent pour la MMP-14 et ils ont déterminé que leur agent était stable dans le plasma. Ce radiotracer n'a pas été utilisé pour l'imagerie, malgré le fait que sa biodistribution indiquait un certain potentiel pour marquer les tumeurs Walker-256 (carcinome mammaire de rat), MRMT-1 (glande mammaire de rat) et FM3A (carcinome mammaire murin). Toutefois, le contrôle négatif (même procédure, anticorps non spécifique) a montré qu'une proportion importante du signal (environ 66% en se fiant à la figure 3 de l'article) était non spécifique. De plus, le produit était éliminé très lentement du sang, ce qui pourrait causer beaucoup de bruit de fond durant l'imagerie. En conclusion, davantage de tests devront être effectués avant de conclure que l'agent est vraiment efficace pour effectuer l'imagerie des MMPs.



Le radiotracer de Sano *et al.* (2010) a été injecté chez des souris C3H/He portant des cellules de carcinome mammaire FM3A, mais ni sa stabilité dans le plasma, ni le maintien de sa spécificité après modification n'ont été vérifiés par les auteurs. Quelques images montrant l'accumulation de l'anticorps au niveau de la tumeur (Fig. 15) sont publiées – mais sans image contrôle (avec compétition) pour les comparer. Un contrôle par compétition montre qu'une proportion importante de l'accumulation en tumeur (60%) est non spécifique. Il est donc difficile d'évaluer le potentiel réel de l'agent pour l'imagerie.

1.3.1.9 Radiotracer activable (pénétration cellulaire) marqué au [^{99m}Tc] ciblant la MMP-14

Watkins *et al.* (2009) ont tenté de détecter la MMP-14 par TEM en se tournant vers les peptides de pénétration cellulaire. Le design de leur agent comprend quatre éléments : un groupe chélateur piégeant un [^{99m}Tc], une séquence D-arginine (chargée positivement, favorisant l'entrée dans les cellules), une séquence d'atténuation (comportant des D-glutamate, chargée négativement), et un substrat peptidique reconnu par la MMP-14. Les auteurs ont optimisé la longueur de la séquence d'atténuation en se basant sur une modélisation informatique. Leurs résultats *in vitro* avec cellules MDA-MB-231 sont toutefois mitigés : lors d'une incubation, 27% de leur sonde activée s'est retrouvé dans les cellules, contre 12% si l'activation de la sonde était prévenue avec un inhibiteur, et contre 2% du complexe ^{99m}Tc(CO₂)₃ (libre). Ces résultats pourraient indiquer que :

- La sonde non activée possède la capacité inhérente d'entrer dans les cellules (45% aussi efficace que la sonde activée),
- L'inhibiteur n'est pas complètement efficace à la concentration utilisée (200 μM), ce qui aurait pu être vérifié en augmentant la concentration.
- D'autres enzymes que les MMPs sont impliquées dans le processus d'activation.

Les auteurs ont conclu que davantage de travail sera nécessaire afin d'optimiser leur sonde avant que celle-ci ne soit fonctionnelle pour l'imagerie.

1.3.1.10 *Marimastat-ArBF₃*

En 2010, l'équipe de Christopher M. Overall a développé un radiotracer basé sur le Marimastat (Fig.16) (auf dem Keller *et al.*, 2010). L'objectif principal (réel) des auteurs était de démontrer que l'emploi d'un précurseur et d' ArBF_3 permet une synthèse éclair de nouveaux radiotraceurs. Grâce à cette méthode, ils ont fonctionnalisé l'inhibiteur à large spectre Marimastat avec un radioisotope (Marimastat- ArBF_3) et avec une fluorescéine (Marimastat-FITC (isothiocyanate de fluorescéine)). Ils ont mesuré l'affinité pour la MMP-2 grâce à un essai d'inhibition ($\text{IC}_{50} = 1.67 \text{ nmol/L}$ et 7.72 nmol/L , respectivement). Les auteurs ont confirmé l'affinité de leur composé fluorescent pour les MMP-2, -9 et -13 grâce à un gel d'électrophorèse (protéines recombinantes pures seulement). **L'essai avec différents échantillons de lysat de tissu a montré que la sonde se liait un peu partout, ce qui se reflète dans leurs résultats d'imagerie *in vivo*** (Fig. 16). Une compétition avec du Marimastat froid a permis d'éliminer complètement le signal à l'endroit où devrait être la tumeur.

Leur radiotracer ne leur a pas permis d'obtenir un contraste intéressant par rapport aux organes d'excrétion, ni même par rapport à la plupart des autres tissus. Leur contrôle négatif (compétition avec le composé froid) leur a toutefois permis de démontrer la spécificité du signal observé dans la tumeur – qui disparaît complètement! Ceci est toutefois étrange, puisque du signal non spécifique est observé dans l'ensemble de l'animal – du signal non spécifique devrait aussi demeurer dans la tumeur. Étant donné la forte captation non spécifique, ces agents ne sont pas adaptés à l'imagerie.

Figure 15. Structure de Marimastat-ArB[¹⁸F₃] et imagerie TEP

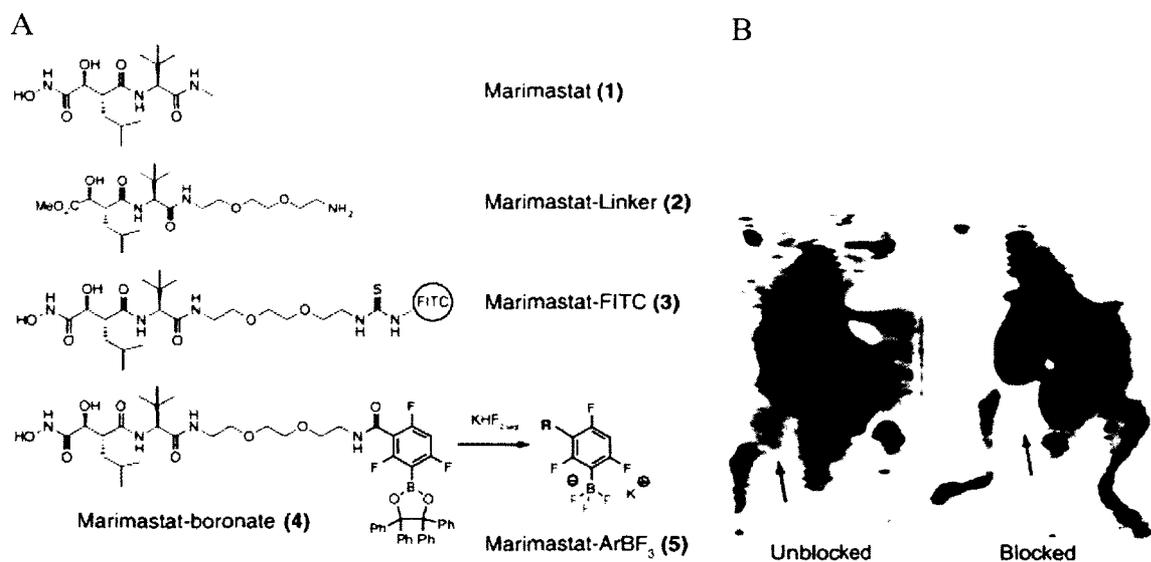


Figure incluse avec permission. "Reprinted by permission from the American Association for Cancer Research: auf dem Keller et al, Novel Matrix Metalloproteinase Inhibitor [¹⁸F]Marimastat-Aryltrifluoroborate as a Probe for In vivo Positron Emission Tomography Imaging in Cancer." *Cancer Res.* 70(19): 7562-7569"

(A) Marimastat modifié avec un groupement FITC (3) ou un groupement ArBF₃ (5). La synthèse de ce radiotracer à partir de son précurseur (4) est très rapide et ne comprend qu'une seule étape. (B) Le traceur s'accumule dans beaucoup d'organes, et les images obtenues montrent que cette accumulation résulte en beaucoup de signal non spécifique.

1.3.2 Agents de contraste pour l'IRM

Étant donné la faible sensibilité de l'IRM par rapport à la TEP et à l'IOF, peu de groupes de recherche ont tenté d'utiliser des agents de contraste afin de cibler les MMPs. Il est possible d'utiliser des stratégies permettant d'augmenter le ratio entre le signal généré et le nombre de molécules cibles présentes lorsque ces dernières sont en faible concentration. Par exemple, l'activation enzymatique de plusieurs molécules sondes par chaque molécule cible permet d'augmenter le signal obtenu.

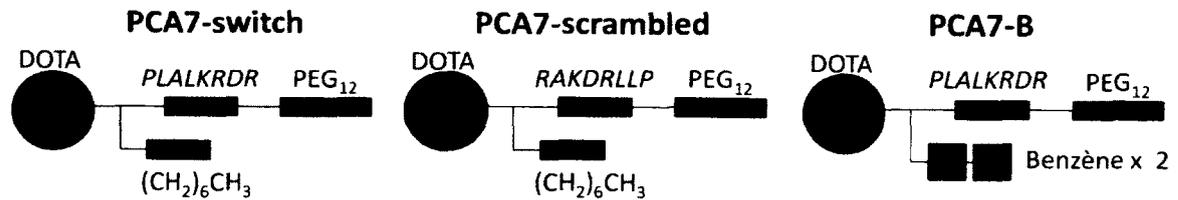
1.3.2.1 PCA7-switch ($[Gd]DOTA-G-K(C_7H_{15})-PLALKRDR-PEG_{12}-\beta A$)

En 2007, Lepage *et al.* ont publié des travaux sur un nouveau type de sonde moléculaire basé sur un commutateur de solubilité (CdS) (Fig. 17) (Lepage *et al.*, 2007). La sonde PCA7-switch (Protease-activated Contrast Agent – MMP-7 specific), composée d'une chaîne latérale alkyle et d'un groupement PEG₁₂, a été comparée à une sonde contrôle non activable brouillée (PCA7-scrambled). PCA7-switch a aussi été comparée à une autre sonde contrôle – la PCA7-B, possédant un di-benzène latéral au lieu de la chaîne alkyle. Les auteurs ont mentionné que l'objectif du contrôle PCA7-B est de tester une sonde activable, similaire, mais sans changement de solubilité. Finalement, les auteurs ont aussi effectué un contrôle de vascularisation et de perméabilité avec du Gd-DOTA, un agent de contraste clinique standard et non spécifique.

Les auteurs ont testé leurs sondes PCA7-switch et PCA7-B *in vitro* en les activant ou non avant leur élution sur une colonne hydrophobe de polystyrène divinylbenzène par HPLC en phase inverse. Les temps d'élution (1.9 et 13 minutes pour PCA7-switch complet et activé, 6.9 et 8 minutes pour PCA7-B) montrent la différence de solubilité causée par l'activation. Le temps d'élution de PCA7-switch s'est révélé très faible (1.9 minutes) avec les conditions HPLC utilisées.

Les sondes ont ensuite été testées *in vivo* dans un modèle de tumeurs sous-cutanée SW480, exprimant (transformées) ou non (WT) la MMP-7. Les auteurs ont détecté une différence de pharmacocinétique de leur sonde PCA7-switch entre les tumeurs. Toutefois, le principe de la sonde ne permet pas de dire si la MMP-7 activée est présente dans une tumeur, mais seulement d'affirmer si cette tumeur l'exprime plus ou moins qu'une autre tumeur.

Figure 16. Structures de PCA7-switch, PCA7-scrambled et PCA7-B



Agent de contraste ciblant la MMP-7 et basé sur le principe de solubilité différentielle. Chaque sonde comprend le chélateur DOTA complexant un ion de Gd^{3+} (pour le contraste), et une séquence clivable spécifiquement par la MMP-7 (PLALKRDR) ou non clivable (RAKDRLLP). Cette séquence est située entre un groupement hydrophile (PEG_{12}) et un groupement hydrophobe (une chaîne alkyle $-(CH_2)_6CH_3$ ou deux cycles benzènes). Théoriquement, lorsque l'enzyme reconnaît et coupe la séquence, la partie hydrophile est retirée, diminuant la solubilité de l'agent de contraste.

Les deux tumeurs devraient être identiques afin de pouvoir effectuer la comparaison. Dans le cas contraire, un contrôle de la perfusion doit être effectué avec une sonde similaire mais non activable, et ce pour chaque animal (par exemple, avec une version de la sonde brouillée ou en acides aminés D) de préférence durant la même injection. Voici d'autres points discutables de l'étude :

- Groupes expérimentaux faibles (PCA7-switch, n=5, PCA7-scrambled, n=1, PCA7-B, n=2)
- Données éloignées non éliminées par les auteurs (voir : table 1, animal 1, tumeur MMP-7 positive, devrait être éliminée avec un test de Grubbs avec une certitude de 95% ($\alpha = 0.05$). Les résultats publiés, lorsque la donnée éloignée est retirée, ne montrent pas de différence significative entre les essais contrôles (PCA7-switch + inhibiteur de MMP, PCA7-scrambled, PCA7-B) et les essais test (PCA7-switch). Ceci est confirmé par un test *t* bilatéral non pairé ($p=0.10$). Toutefois, une tendance en ce sens est présente – un nombre d'animaux plus élevé aurait peut-être permis de mettre cette différence en évidence de manière significative.
- Variation importante des cinétiques du Gd-DOTA entre les tumeurs MMP-7 positive et négative – cette variation n'est pas mise en évidence par les auteurs, mais

est visible dans les figures et pourrait expliquer une partie des variations observée entre les tumeurs avec PCA7-switch.

- Test avec PCA7-switch et inhibiteur de MMP. Une variation statistique entre les tumeurs positive et négative est trouvée dans un animal sur deux. Ceci pourrait être expliqué par le fait qu'une différence existe entre les tumeurs ou que l'inhibiteur n'est pas efficace à 100% dans les conditions testées.
- Un seul animal a reçu la sonde contrôle PCA7-scrambled, et une forte différence de pharmacocinétique est détectée entre les tumeurs.

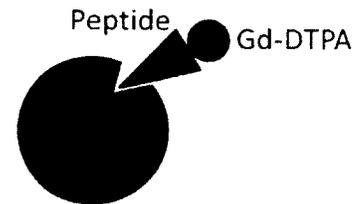
Davantage de tests seront nécessaires afin de confirmer l'efficacité de l'agent PCA7-switch pour effectuer l'imagerie de l'activité de la MMP-7.

1.3.2.2 P947 fonctionnalisé au DOTA-Gd

En 2008, 2009 et en 2010, une série d'articles concernant l'agent de contraste P947 a été publiée (Lancelot *et al.*, 2008; Amirbekian *et al.*, 2009; Bazeli *et al.*, 2010; Hyafil *et al.*, 2010). P947 est un peptide inhibiteur ciblant les MMPs lié à un DOTA-Gd (Fig. 18).

Figure 17. Principe de l'agent de contraste P947

Schéma de P947 – Un inhibiteur peptidique fonctionnalisé avec un groupement chélateur (DTPA) piégeant un Gd. Ce type d'agent effectue une liaison 1:1 avec les MMPs. Au mieux, la concentration d'agent présente au site tumoral est la somme de la concentration de ses cibles.



Bien que la séquence peptidique de l'agent ne soit pas publique, elle possède une affinité élevée pour plusieurs MMPs (entre autres -1, -2, -3, -8, -9, -13 et -14). Dans le manuscrit publié par Bazeli *et al.* (2010), les auteurs ont comparé P947 et un contrôle non spécifique (P1153), ainsi que du Gd-DOTA dans un modèle d'anévrisme aortique abdominal (AAA) chez le rat. Ce modèle comporte une inflammation importante du mur aortique induite par une infusion d'élastase. La sécrétion d'une quantité importante de MMPs, telle qu'attendue dans ce modèle, a été confirmée *ex vivo*. Après cinq minutes, les auteurs ont observé une augmentation du signal plus importante avec P947 (2.6x) qu'avec P1153 (2x) ou Gd-DOTA (2.2x) comparativement au signal pré-injection (1x) et ont confirmé la co-

localisation de l'activité des MMPs par zymographie *in situ* dans les régions où l'augmentation du signal était visible par IRM. Toutefois, l'étude a plusieurs faiblesses :

- Les différences de signal absolu sont très faibles et trop rapides, et pourraient être dus à un mauvais dosage des agents ou à des différences intrinsèques entre les molécules (p. ex. relaxivité, affinité); normalement, dans les 5 premières minutes (soit le premier passage de la molécule), le signal est principalement non spécifique.
- Les auteurs n'ont pas confirmé la spécificité de la liaison de P947 *in vivo* en effectuant une compétition avec l'inhibiteur non modifié ou un autre inhibiteur à large spectre, ce qui aurait permis aux auteurs de mesurer la proportion de signal spécifique.
- Étant donné la faible sensibilité de l'IRM, il est surprenant qu'un agent permette de détecter les MMPs en liaison 1 pour 1. La concentration de MMPs dans le modèle n'a pas été déterminée, ce qui rend impossible une comparaison absolue de cette concentration avec celle de l'agent. Toutefois, il est possible de calculer que 181 μM de MMP sont nécessaires pour expliquer l'augmentation de signal obtenue, une valeur très élevée pour une enzyme, que ce soit *ex vivo* ou *in vivo*.
- Planification expérimentale erronée (en série): Dans 3 des 4 manuscrits, les auteurs ont toujours effectué une séance d'imagerie avec P947 une semaine avant d'effectuer l'imagerie avec la sonde contrôle. Or, P947 est un inhibiteur de MMPs et est injecté en quantité élevée (100 μmoles , soit $\sim 50 \text{ mM}$ dans 2 mL de sang, et $\sim 2.5 \text{ mM}$ distribué dans une souris de 20 g). Il risque donc d'avoir un effet sur l'inflammation et la dégradation de la matrice extracellulaire, et peut influencer les séances d'imagerie qui sont effectuées avec le contrôle par la suite.
- Les auteurs n'ont pas présenté de pharmacocinétique détaillée de leur agent de contraste (le temps d'imagerie est de 19 minutes), ce qui rend difficile l'interprétation des intensités de signal observées : S'il y a une accumulation est-elle causée par une liaison spécifique ou une pharmacocinétique différente?

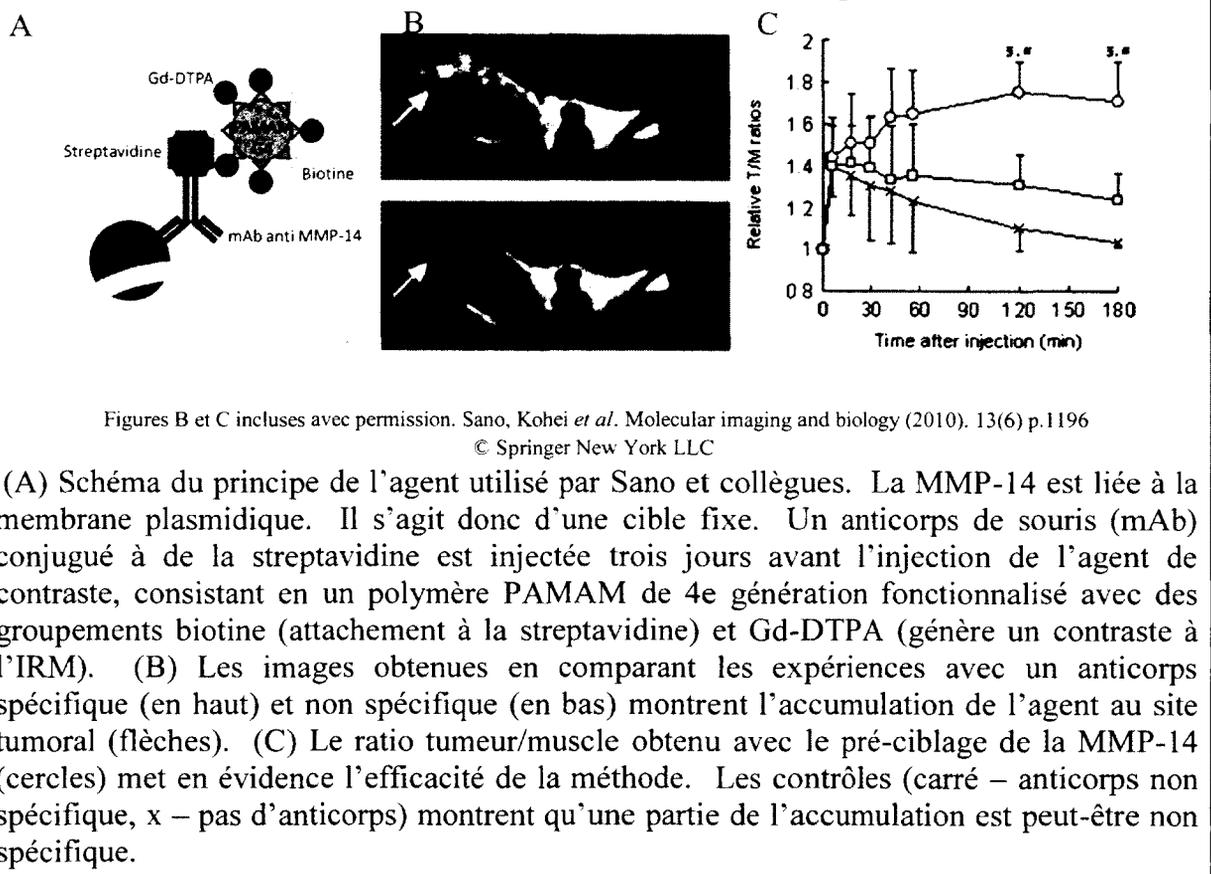
Dans la publication par Amirbekian *et al.* (2009), les pharmacocinétiques de P947 et de 1135 (un contrôle avec peptide brouillé) sont présentées côte à côte (Figure 2 de la référence) – mais contrairement aux autres publications, la planification des tests est en parallèle et non en série. Bien que le signal absolu de P947 soit plus élevé, le taux d'élimination de P1135 est similaire à celui de P947 (Voir annexe II) – ce qui signifierait que les deux molécules sont comparables du point de vue de leur affinité pour les tissus observés. En conclusion, davantage de contrôles seront nécessaires avant de pouvoir déterminer la véritable spécificité de P947.

1.3.2.3 Anticorps-Streptavidin et polymère PAMAM-Biotin-Gd-DTPA (MMP-14)

En 2010, le groupe de recherche de Hideo Saji, mentionné dans la section précédente, est parvenu à développer une méthode d'imagerie pour détecter la présence de la MMP-14 active et inactive par IRM (Sano *et al.*, 2010). L'enzyme a initialement été marquée *in vivo* de manière spécifique grâce à un anticorps monoclonal (mAb). Trois jours plus tard, l'agent de contraste est injecté: un polymère polyamidoamine (PAMAM) fonctionnalisé avec des groupements biotine et des groupements Gd-DTPA. Les résultats ont montré que l'agent de contraste (Fig. 19A) s'accumulait au niveau du site tumoral (Fig. 19B et C). Plusieurs éléments permettent d'expliquer ce succès, entre autres :

- Une relaxivité élevée ($15.5 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$, contre $3.6 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pour le Gd-DTPA libre, à 1.5 T) – la molarité indiquée réfère au Gd^{3+} complexé.
- Fonctionnalisation avec 47.6 groupements Gd-DTPA par molécule de polymère PAMAM. Une molécule de cet agent génère donc un contraste environ 47.6 fois plus efficacement qu'une molécule liant sa cible 1 :1 et ne portant qu'un seul Gd-DTPA.
- Une bonne stabilité plasmatique (*ex vivo*) du produit (>90% après 24 h)

Figure 18. Anticorps-PAMAM-[Gd]DTPA : Principe et résultats *in vivo*



Grâce à ces attributs, la liaison 1:1 de l'agent avec la cible permet la détection de la MMP-14 malgré la sensibilité relativement faible de l'IRM. La pharmacocinétique (Fig. 19, droite) a montré que l'agent reste beaucoup plus longtemps dans les tumeurs lorsqu'un pré-ciblage spécifique est effectué, contrairement à un pré-ciblage non spécifique ou sans pré-ciblage.

Il y a deux limitations à cette méthode : La taille de l'agent l'empêche fort probablement d'entrer dans les tissus avec une fenestration (perméabilité) normale, et l'anticorps reconnaît à la fois les formes actives et inactives de l'enzyme – empêchant du même coup de faire un suivi de l'activité de la MMP-14. Il aurait été intéressant d'effectuer un contrôle avec une tumeur avec une expression faible ou nulle de la MMP-14, ce qui nous aurait permis d'apprécier davantage la spécificité de l'agent.

1.3.2.4 Oligodésoxynucléotides jumelé à de petites particules oxyde de fer

En 2009, Liu *et al.* ont utilisé un modèle d'ischémie cérébrale global chez la souris C57/b6 afin de tester une sonde SPIO (oxyde de fer) fonctionnalisée avec une séquence d'ADN complémentaire à l'ARNm de la MMP-9 (Liu *et al.*, 2009). Leur sonde, qui a été injectée au niveau des ventricules cérébraux, est stabilisée grâce à des modifications chimiques qui préviennent sa dégradation *in vivo*. Bien que leurs résultats ont montré que la sonde s'accumulait dans le striatum et le cortex des animaux lésés contrairement à une sonde contrôle (ARN scrambled), il y a des failles de compréhension trop importantes pour être ignorées : Les auteurs n'ont pas expliqué 1) comment les sondes sont internalisées malgré leur masse et la présence d'une charge négative importante, 2) comment elles se retrouvent dans le cytosol pour lier leur cible, et 3) comment la sonde contrôle est externalisée de la cellule et éliminée du cerveau à l'intérieur de sept heures. En fait, il n'y a aucune évaluation de la pharmacocinétique des sondes, empêchant ainsi de les comparer directement, ce qui confirmerait que la liaison à la cible est responsable pour la différence de R_2^* observée, et non une différence intrinsèque des molécules sonde et contrôle.

1.3.3 Sondes optiques pour l'IO

Les premiers développements de sondes optiques remontent à une douzaine d'années, alors qu'une équipe de recherche du Harvard Medical School (Boston, É.U.) a publié une série d'articles portant sur des sondes fluorescentes activées par des protéases (Tung *et al.*, 1999; Weissleder *et al.*, 1999). Christoph Bremer, Ralph Weissleder, Ching-Hsuan Tung et Umar Mahmood ont ainsi pavé la route vers le développement de sondes pour l'imagerie *in vivo* de l'activité des MMPs.

1.3.3.1 Sonde [FITC-GPLGVRGK]*n*-poly-Lys

En 2001, Bremer et collègues ont publié une première sonde permettant de détecter l'activité de la MMP-2 (Fig. 20) (Bremer *et al.*, 2001). Cette sonde activable est basée sur l'autoextinction de la fluorescence avant clivage (par proximité des fluorophores). Les groupements fluorescents (Fluorescéine Isothiocyanate - FITC) sont étroitement regroupés sur un squelette de poly-Lysine, avec pour conséquence l'atténuation (« quenching ») de la fluorescence par les molécules de FITC voisines avec une efficacité de 86%. Nous référerons à ce type de sonde par FPP, pour fluorophore-peptide-polymère. Le lien entre le

squelette et les groupes fluorescents est composé d'une chaîne peptidique GPLGVRGK qui est un substrat pour la MMP-2. En coupant ces peptides, l'enzyme libère les groupements fluorescents, et augmente leur signal par environ 7 fois. Injectée dans un modèle de tumeur sous-cutanée (souris *nu/nu*), cette sonde s'accumule davantage dans une tumeur MMP-2 positive (fibrosarcome HT1080) que dans une tumeur MMP-2 négative (carcinome mammaire BT-20). Toutefois, la spécificité de l'activation n'est nullement discutée ou évaluée, et la perfusion des tumeurs n'est pas vérifiée.

Figure 19. Structure de FITC-GPLGVRGK-poly-Lys et imagerie optique

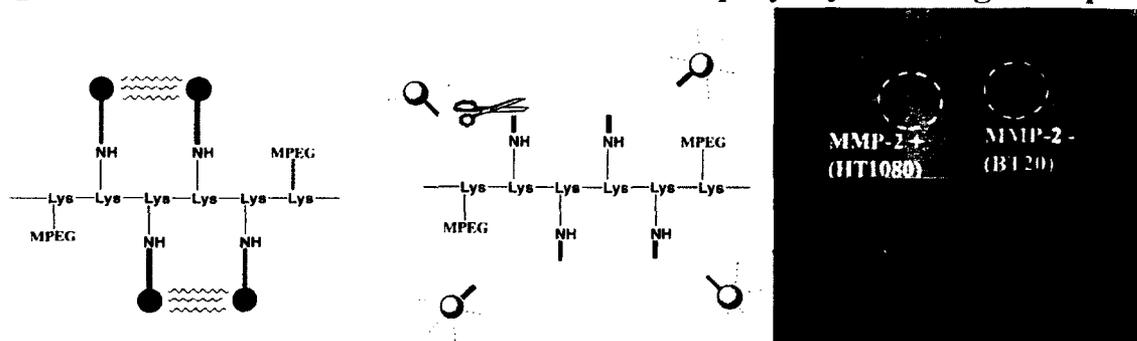


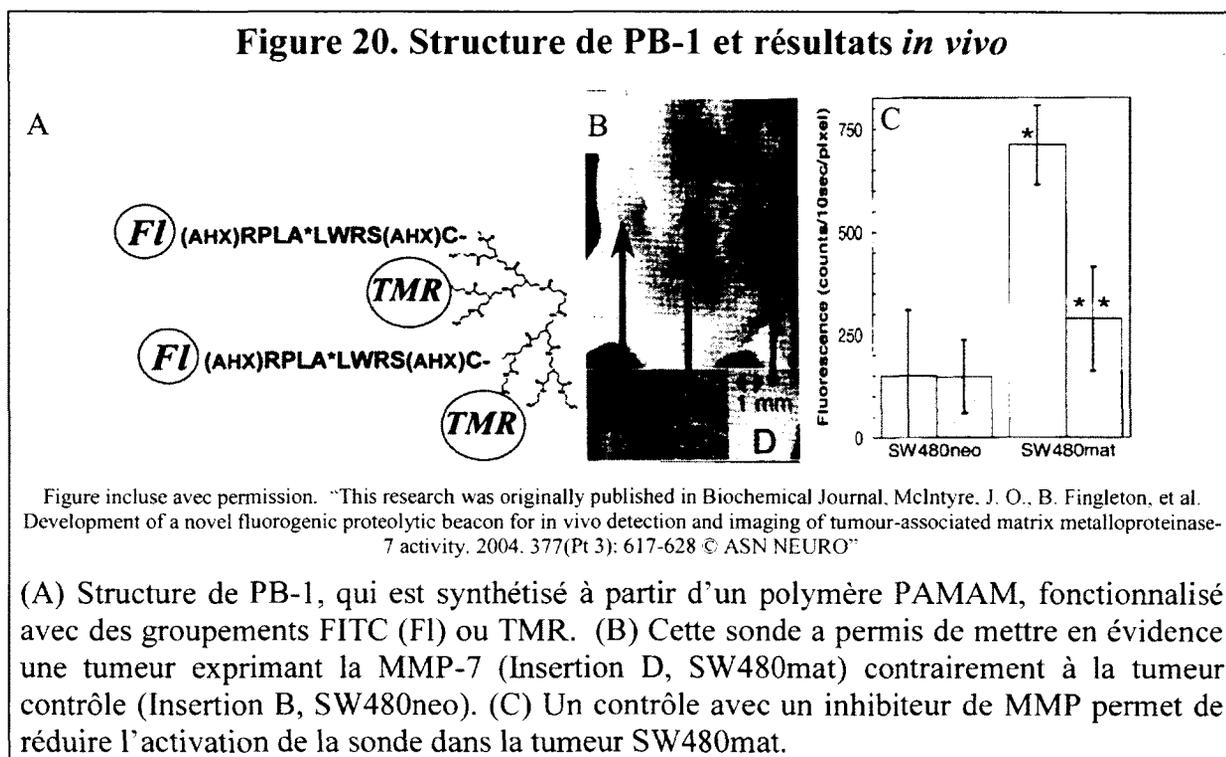
Figure incluse avec permission. "Figures 1, 5, Bremer C, Bredow S, Mahmood U, et al. Optical imaging of matrix metalloproteinase-2 activity in tumors: feasibility study in a mouse model. *Radiology* 2001;221:523-529. ©2001 The Radiological Society of North America (RSNA®)"

Première sonde permettant de détecter l'activité de la MMP-2. Cette sonde est basée sur l'atténuation de la fluorescence par proximité de 2 groupements fluorescents liés à un squelette de poly-Lys par un peptide reconnu et dégradé par la MMP-2 (à gauche). Le relâchement des groupements fluorescents (activation) permet à la fluorescence d'être émise et détectée (au centre). Cette sonde a permis de différencier entre une tumeur MMP-2 négative (BT20) et une tumeur MMP-2 positive (HT1080) (à droite).

1.3.3.2 Sondes [FITC-RPLALWRS]*n*-PAMAM-[TMR]*n* et [AF750-RPLALWRS]*n*-PAMAM-[Cy5.5]*n* ciblant la MMP-7

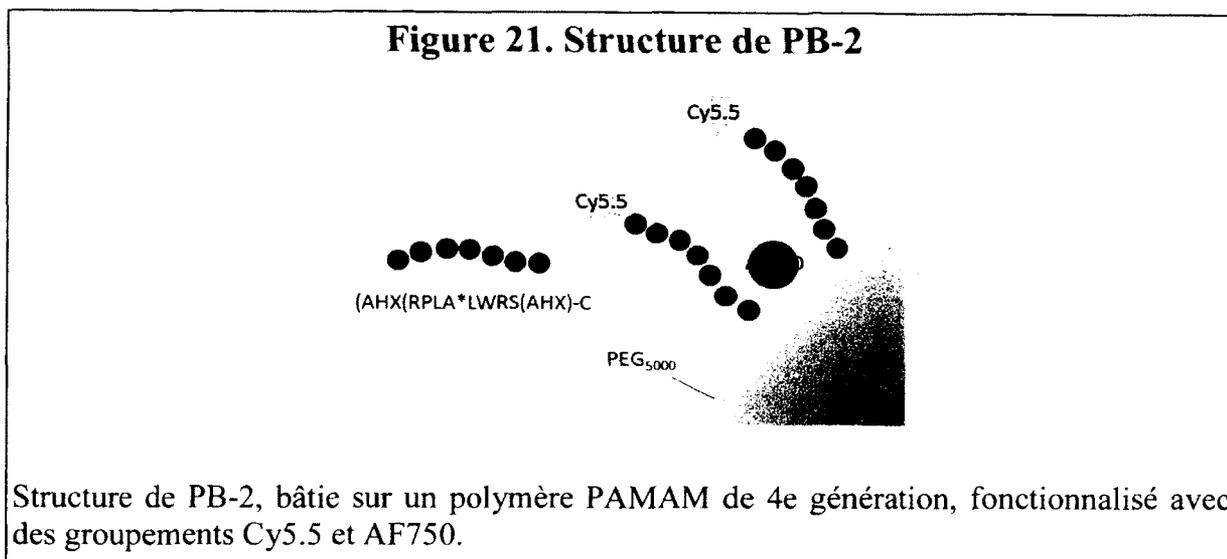
En 2004, l'équipe de Lynn Matrisian (Vanderbilt University, Nashville, É.U.) a publié des résultats obtenus avec une sonde FPP ciblant la MMP-7 (McIntyre *et al.*, 2004), à laquelle nous référerons en tant que PB-1 (Proteolytic Beacon, Fig. 21). Les auteurs ont obtenu des résultats intéressants malgré l'emploi de fluorophores dont l'émission est hors de la région optimale du spectre pour l'imagerie *in vivo* (FITC/TMR (tétraméthylrhodamine) comme fluorophores témoin/référence, respectivement). Une seconde itération avec une sonde portant des fluorophores plus adaptée à l'imagerie *in vivo* (Cy5.5/Alexa Fluor 750

(AF750)) a été publiée en 2008 (Scherer *et al.*, 2008). Nous dénoterons cette seconde sonde PB-2 (Fig. 22). Les sondes PB-1 et PB-2 se démarquent par rapport aux autres sondes décrites dans la section 1.3.3 par leur design qui comprend un polymère de type PAMAM comme échafaudage, et un fluorophore contrôle – c'est-à-dire dont la fluorescence n'est (presque) pas modifiée lors de l'activation de la sonde. Il s'agit ici d'une innovation importante visant à obtenir le ratio d'activation de la sonde sur la quantité totale de sonde présente. L'efficacité de la MMP-7 pour dégrader PB-1 (ratio des constantes catalytique de la réaction enzymatique (k_{cat}) et de la constante de Michaelis-Menten (K_M): $k_{cat} / K_M = 1.9 \times 10^5$) est un ordre de grandeur plus élevé que dans le cas de la sonde de Bremer *et al.* (2004) – et bien qu'aucune confirmation du k_{cat}/K_M pour PB-2 n'ait été effectuée, la même séquence peptidique est utilisée.



Les auteurs ont confirmé (partiellement) la spécificité de la sonde PB-1 en mesurant aussi son activation avec les MMP-2 et -3, montrant que ces deux dernières activent la sonde avec un k_{cat}/K_M 10 et 50 fois moins élevés qu'avec la MMP-7, respectivement. Des essais supplémentaires de digestion de la PB-1 avec d'autres enzymes ont permis de mesurer la vitesse de dégradation de la sonde comparativement à la MMP-7. La pronase E (40%), la

trypsine (5%), la protéase K (5-10%) se sont révélées relativement efficaces, contrairement à la collagénase bactérienne (1%). Bien qu'une fois de plus la sonde PB-2 n'a pas subi ces contrôles, les auteurs ont confirmé qu'elle n'est pas un substrat pour les cathepsines B et L.



Pour PB-1 et PB-2, la variation de fluorescence après activation était de 5 fois, soit une médiocre extinction de 80%. Malgré ceci, les résultats *in vivo* semblent démontrer que ces sondes permettent de détecter l'activité de la MMP-7. Pour ce faire, les auteurs ont utilisé un modèle de tumeurs sous-cutanée SW480, qui n'expriment pas (SW480neo) ou expriment (SW480mat) la MMP-7. Les résultats avec PB-1 ont montré une fluorescence deux fois plus élevée dans la tumeur SW480mat que dans la région contrôle (dos). Les auteurs ont effectué une comparaison avec et sans inhibiteur de MMP à large spectre (BB-94, Batimastat), et ont montré une différence significative de fluorescence pour la tumeur SW480mat (~57% de moins), mais aucune différence pour la tumeur SW480neo. Il y a toutefois certains éléments intrigants dans les études :

- Le contrôle négatif avec l'inhibiteur a été effectué sur 48 heures (1 dose/24 heure, 3 doses), mais les auteurs n'ont pas déterminé l'impact du traitement sur l'acheminement d'agent dans la tumeur SW480mat. Les contrôles négatifs optimaux sont discutés dans le chapitre 6.
- Les valeurs de fluorescence témoin (F) et de référence (R) ne correspondent pas très bien entre les tumeurs et entre elles. De manière générale, la différence de signal

entre la sonde activée et la sonde non activée, relativement au signal de référence, ne devrait pas dépasser l'inverse de l'atténuation (donc environ 5x). Or, pour PB-2 ((Scherer *et al.*, 2008), Figure 4), des ratios F/R de 2,3 sont observés dans les tumeurs MMP-7 négative, et de 692 dans les tumeurs MMP-7 positive, soit un ratio de 355 entre les tumeurs!

En conclusion, bien que les résultats semblent prometteurs pour l'imagerie *in vivo*, il est de l'avis de l'auteur de cette thèse que des mesures et calculs plus poussés et des contrôles supplémentaires doivent être effectués afin de mettre en évidence le plein potentiel et les limitations de ces nouvelles sondes.

1.3.3.2 Sonde Cy5.5-GVPLSLTMGC-NIRQ820 spécifique à la MMP-7

En 2004, le groupe de Tung et Weissleder a récidivé en publiant un article à propos d'une nouvelle sonde à base de Cy5.5 (Chen *et al.*, 2005), mais avec une nouvelle structure (Fig. 23) ne comportant que le substrat peptidique GVPLSLTMGC, entouré par un Cy5.5 d'un côté, et par le groupement NIRQ820 (« Quencher ») de l'autre côté (sonde de type FPQ, Fluorophore-Peptide-Quencher). Le substrat est reconnu et clivé par la MMP-7 (un seul contrôle de la spécificité effectuée avec MMP-9). Avec une efficacité d'atténuation de 87,5% et un k_{cat}/K_M de $1,2 \times 10^5$, cette sonde n'a pas été testée *in vivo*.

Figure 22. Structure de Cy5.5-GVPLSLTMGC-NIRQ820

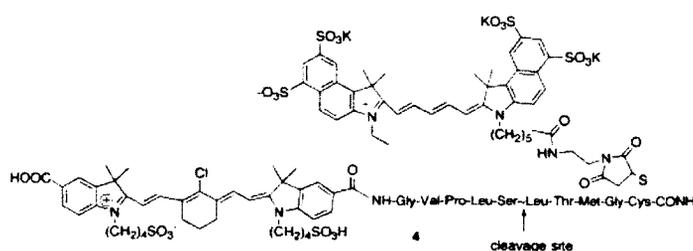


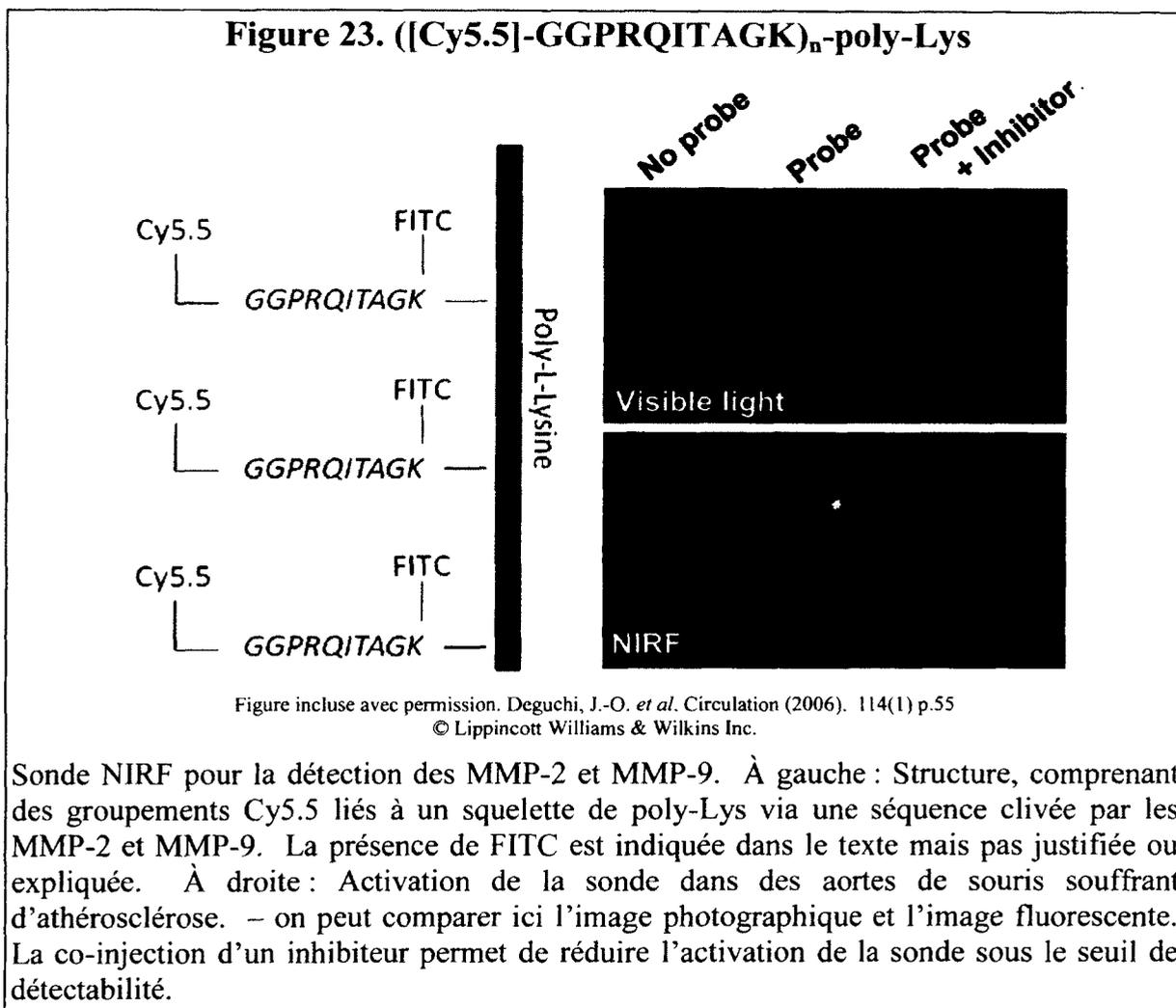
Figure incluse avec permission. Chen, J. *et al.* Circulation (2005). 111(14) p.1800
© Lippincott Williams & Wilkins Inc.

Structure de la sonde Cy5.5-GVPLSLTMGC-NIRQ820

1.3.3.3 Sonde [Cy5.5-GGPRQITAGK]_n-poly-Lys

En 2005, le même groupe a publié à propos d'une sonde FPP sensible aux MMP-2 et -9 (Fig. 24), de structure similaire à celles publiées par Bremer *et al.* (2001), mais avec un groupement fluorescent Cy5.5 – se rapprochant davantage d'une autre sonde développée

pour détecter l'activité de l'urokinase et publiée par le même groupe (Law *et al.*, 2004). Les auteurs ont utilisé le substrat GGPRQITAGK efficacement clivé par la MMP-9 ($k_{cat}/K_M = 1,88 \times 10^5$) et la MMP-2 (pas de valeur de k_{cat}/K_M fournie, mais similaire à la MMP-9). L'atténuation de son signal est excellent (99, 5%). L'essai *in vivo* de la sonde a été conduit sur un modèle d'infarctus du muscle cardiaque (souris C57BL6J). Les auteurs ont établi un profil sur 4 semaines de l'activation de la sonde, avec un pic de fluorescence après 1 semaine. La quantification de l'ARN messenger codant pour les MMP-2 et -9 et une zymographie de l'activité de ces enzymes ont permis de corrélérer le profil de fluorescence avec le profil de la MMP-9, mais pas avec celui de la MMP-2 (qui suit une tendance inverse). Les auteurs n'ont toutefois effectué aucun contrôle de la spécificité ou de la distribution de la sonde.



En 2006, dans une seconde publication (Deguchi *et al.*, 2006), cette sonde a été testée *in vivo* dans laquelle les auteurs ont différencié, *ex vivo* et *in vivo*, entre des souris normales ou souffrant d'athérosclérose (souris ApoE^{-/-} avec diète riche en cholestérol). Un signal important a été détecté au niveau de l'aorte des souris ApoE^{-/-}, correspondant à la présence de plaques tel que confirmé par histologie. Toutefois, aucun contrôle négatif n'est venu soutenir les résultats observés dans ces deux études. L'inflammation de l'aorte aurait pu causer une augmentation de la perméabilité vasculaire, et donc une accumulation non spécifique de la sonde, peu importe que la sonde soit activée localement ou de manière systémique, par exemple dans le sang.

1.3.3.4 Sonde [CPPi -CPP]n-Quantum Dots ciblant les MMP-2 et MMP-7

Les nanocristaux de petite taille, aussi appelés points quantiques (« Quantum Dots » - QD), sont des particules semi-conductrices qui possèdent des propriétés de fluorescence intéressantes pour l'imagerie optique : Rendement quantique et extinction molaire élevée, ainsi qu'une bande d'émission étroite et dont la longueur d'onde est déterminée par la taille du QD. Zhang, So et Rao (2006) ont utilisé une couche de streptavidine afin de lier un ligand comprenant une biotine à leurs QDs. Ce ligand consiste en une biotine jumelée à 4 arginines (chargées positivement, un peptide de pénétration cellulaire (CPP) permettant l'entrée cellulaire des QD), une séquence peptidique reconnue par les MMP-2 et -7, puis une séquence bloquante (4-5 acide glutamique, chargés négativement, CPP_i, inhibant l'action du CPP) (Fig. 25). La différence de captation cellulaire entre les sondes non activées et activées était de 827 fois, un résultat fort probant de l'efficacité de leur design. Le principal point faible de ces travaux est le manque de caractérisation des sondes au niveau enzymatique (la digestion est-elle efficace et spécifique?) et l'absence de résultats *in vivo*. L'encombrement des groupements chargés pourrait provoquer un ralentissement important de la digestion, avec comme résultat une activation trop lente de la sonde *in vivo* pour qu'elle soit effective. Aucun développement supplémentaire n'a été rapporté à ce jour.

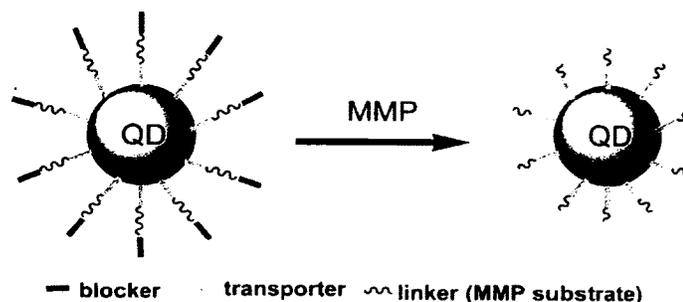
Figure 24. Quantum Dots avec CPP

Figure incluse avec permission. Zhang, Yan *et al.* *Angewandte Chemie* (2006). 45(30) p.4936
© WILEY - V C H VERLAG GMBH & CO. KGAA.

Points quantiques fonctionnalisés avec un échafaudage streptavidine-biotine-polyArg-peptide-polyGlu. La digestion du peptide permet le retrait du polyGlu qui neutralise le polyArg. Celle-ci, chargée positivement, facilite l'entrée en cellule du QD.

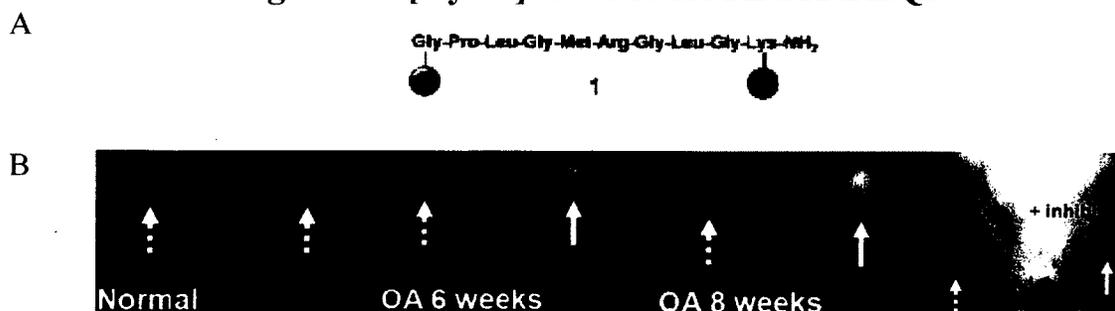
Figure 25. [Cy5.5]-GPLGMRGLGK-BHQ3

Figure incluse avec permission. Lee, Seulki *et al.* *Bioconjugate chemistry* (2008) 19(9)

© American Chemical Society

(A) Sonde optique de type FPQ dirigée vers la MMP-13 comprenant un groupement Cy5.5 (Mauve) et le « black hole quencher 3 » (BHQ3) (noir). (B) Cette sonde est testée dans un modèle d'arthrite chez la souris. Les temps indiqués correspondent à la progression de la pathologie. La sonde est injectée intra-cartilage – ce qui réduit la possibilité de l'activation en périphérie et le bruit de fond de la sonde. La co-injection d'un inhibiteur (flèche pleine, dernière image) dans un animal au temps de 8 semaines empêche l'activation de la sonde, et ramène le signal mesuré au signal du cartilage non affligé (flèche pointillée).

13.3.5 Sonde Cy5.5-GPLGMRGLGK-BHQ3 ciblant la MMP-13

En 2008, une équipe sud-coréenne a publié une sonde FPQ ciblant la MMP-13 (Fig. 26) (Lee *et al.*, 2008), dont ils ont partiellement optimisé la spécificité en 2010 en testant différentes séquences peptidiques vs les MMPs 2, 7 et 9 (Ryu *et al.*, 2011). Cette sonde, composée des groupements Cy5.5 et BHQ3 a été testée *in vivo*, avec et sans inhibiteur de la

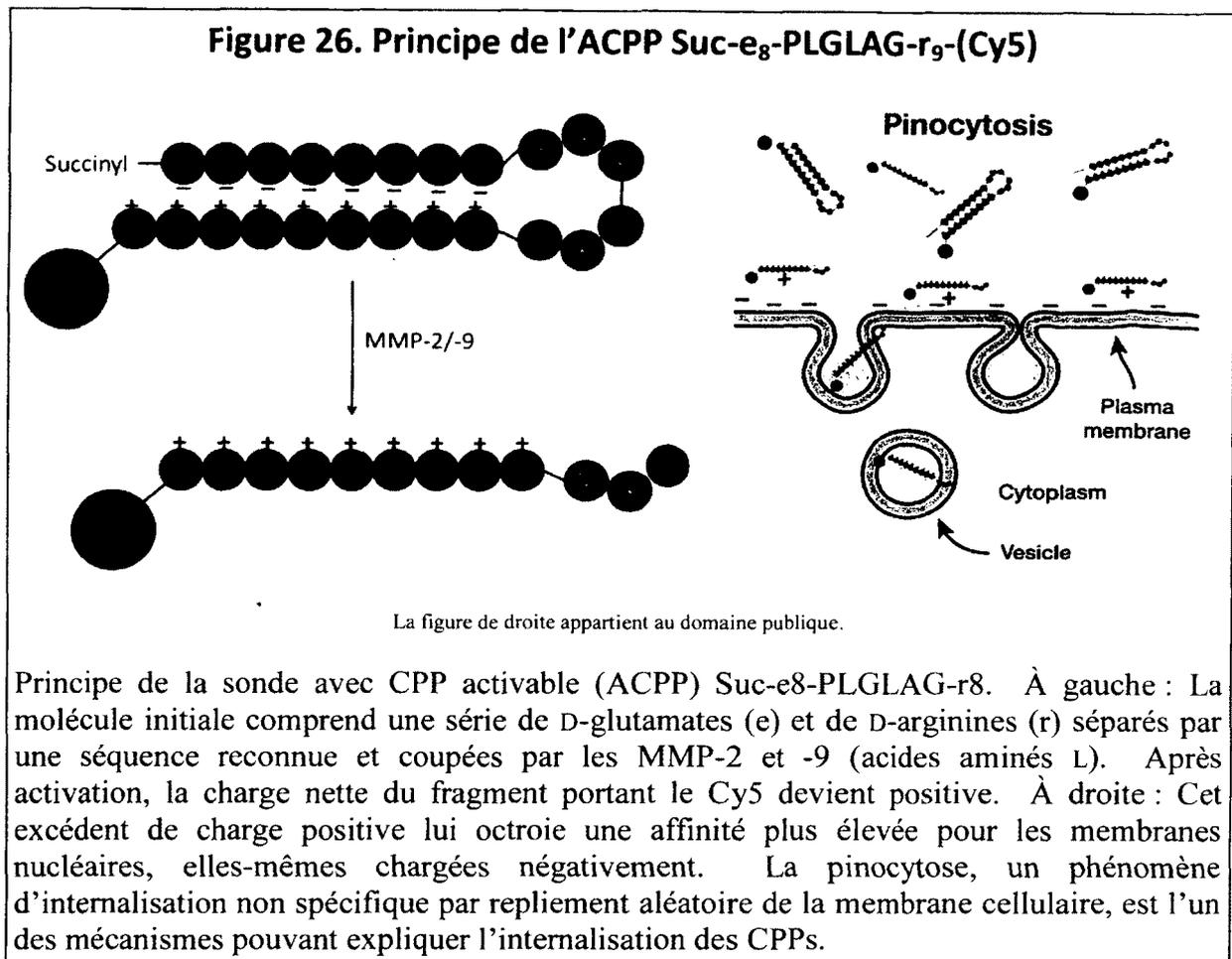
MMP-13, dans un modèle d'arthrite chez la souris. L'équipe a effectué un suivi de 8 semaines et obtenu d'excellentes images en fluorescence montrant clairement une augmentation du signal après une injection de 100 µL de la sonde intra-cartilage (*imageur de Advanced Research Technology, Montréal*) - un type d'injection très à-propos puisqu'il permet d'éliminer une partie importante du bruit de fond dans le reste de l'animal. Toutefois, dans leurs résultats, ils ont présenté une image d'animal contrôle avec un bruit de fond élevé, ce qui nous indique qu'il est probable que la molécule ne serait pas utilisable en injection intraveineuse.

1.3.1.6 Sonde CPP activable spécifique aux MMP-2 et MMP-9

En 2009, le laboratoire de Roger Y. Tsien a publié une étude portant sur une sonde de type CPP : Suc-e₈-xPLGLAG-r₉-(Cy5) (Fig. 27) (Olson *et al.*, 2009). Les auteurs ont testé leur sonde dans un modèle de tumeurs sous-cutanée chez des souris immunodéficientes, mais aussi chez des souris PyMT. Les souris PyMT portaient une mutation causant l'apparition spontanée de tumeurs mammaires. De plus, en utilisant une version KO MMP-2^{-/-} et MMP-9^{-/-} des souris PyMT, les auteurs ont comparé leur sonde et un contrôle non clivable ce qui a permis de déterminer que 89% de l'activation de leur sonde *in vivo* était due à ces enzymes. Cette quantification est d'autant plus précise qu'elle a été effectuée par l'extraction des organes et dosage du fluorophore *ex vivo*. Les auteurs ont toutefois indiqué que la séquence peptidique choisie n'était pas complètement spécifique (résultats *in vitro*) et que leur contrôle négatif en acides aminés D était légèrement activé (supposément *via* les glycines, qui sont achirales). Il serait intéressant de vérifier si la sonde est activée à l'intérieur de la tumeur, ou partout dans l'animal avant d'être acheminée à la tumeur par effet EPR. Le dernier contrôle à effectuer serait d'évaluer l'activation de la sonde dans des souris immunodéficientes MMP-2^{-/-} MMP-9^{-/-} portant une xéno greffe de cellules exprimant la MMP-2, avec ou sans inhibition. De cette manière, cela permettrait de confirmer que l'activation de la sonde est spécifique non seulement aux enzymes, mais aussi aux tissus exprimant ces enzymes.

Il est intéressant de noter que cette sonde a été comparée à un contrôle positif (sonde pré-activée) dans une autre publication (Aguilera *et al.*, 2009). Les auteurs ont démontré que l'inhibition de la sonde par le fragment poly-anionique empêchait la sonde de se lier

immédiatement aux premières cellules qu'elle rencontre, et donc la sonde avait davantage de temps pour passer par les tumeurs.



En 2010, la même équipe a développé des dendrimères comportant les mêmes ACPP et contenant du Cy5 et du Gd-DOTA (Olson *et al.*, 2010). Ceci leur a permis de marquer les tumeurs avec un meilleur contraste tumeur/peau que la sonde MMPsense 680 (décrite plus loin), et d'améliorer la survie post-résection (Nguyen *et al.*, 2010).

1.3.3.6 Peptide cyclique [CTTHWGFTLC]-Cy5.5 ciblant les MMP-2 et MMP-9

En 2009, Wang et collaborateurs ont utilisé un peptide inhibiteur cyclique spécifique aux MMP-2 et -9 développé par Koivunen *et al.* (1999) et l'ont fonctionnalisé avec un groupement Cy5.5, et ont obtenu une sonde fluorescente (Wang *et al.*, 2009). La spécificité du peptide seul a été initialement évaluée contre les MMP-8 et 13, ainsi que la trypsine-2, l'élastase de neutrophile et la cathepsine G (Koivunen *et al.*, 1999). Les auteurs

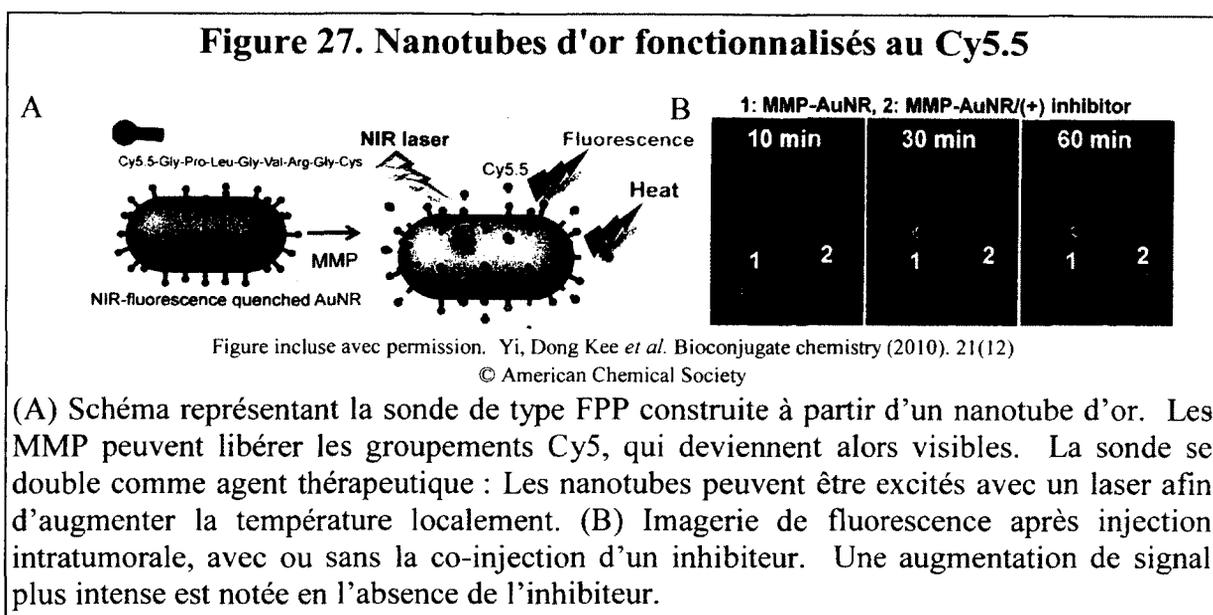
ont démontré sur trois types de cellules en culture que la sonde s'accumulait dans les lignées exprimant la MMP-2 (PC-3 et U87) et non dans la lignée négative pour la MMP-2 (A549). Point intéressant : les auteurs ont utilisé les cellules A549 comme contrôle négatif, alors qu'Oltenfreiter *et al.* (2006) les considéraient plutôt comme contrôle positif, avec zymographie à l'appui pour les MMP-9 et MMP-2 (Oltenfreiter *et al.*, 2006). Les auteurs ont poursuivi avec deux essais *in vivo* en utilisant deux modèles de tumeurs (PC-3 intra-tibia et U87 intra-craniale). Un contrôle sous la forme d'un peptide brouillé a été effectué. Bien que seule la sonde normale soit visible dans les tumeurs 48h post-injection, il a été impossible de réduire le signal par compétition avec de la doxycycline (inhibiteur de MMP à large spectre). Ceci pourrait indiquer que l'accumulation était non spécifique et que le comportement de la sonde brouillée était simplement différent de celui de la sonde test, ou que la sonde et l'inhibiteur ne liaient pas exactement le même site sur les MMPs. Une caractérisation plus poussée sera nécessaire afin de confirmer le potentiel de cette sonde.

1.3.3.7 Sonde [Cy5.5-GPLGVRGC]n-nrAu (nanotubes d'or fonctionnalisés)

En 2010, Yi et collègues ont publié leurs résultats préliminaires d'une sonde FPP pouvant servir de vecteur pour la thérapie (Fig. 28) (Yi *et al.*, 2010). En remplaçant le squelette habituel d'une sonde FPP par un nanotube d'or, ils ont obtenu un agent d'imagerie activable pouvant être excité à l'aide d'un laser afin d'augmenter localement la température. Le peptide de la sonde peut être clivé par différentes MMPs (entre autres, les MMP-2, 3, 9 et 13). Puisque la séquence peptidique était liée à l'or *via* une cystéine, il était aussi possible d'activer la sonde en réduisant cette liaison avec du DTT, et ainsi obtenir une activation complète de la sonde, et de calculer l'efficacité réelle de l'atténuation– ainsi que l'efficacité des MMPs à activer la sonde. Grâce à ce contrôle positif, les auteurs ont déterminé que l'encombrement stérique empêchait les MMPs d'activer toute la sonde (33% de la sonde est non activée).

Après avoir confirmé que leur molécule n'était pas toxique en culture cellulaire, les auteurs ont évalué leur sonde *in vivo*. Ils ont utilisé un modèle tumoral SCC-7 sous-cutané chez la souris athymique et effectué une injection intra-tumorale. Un signal important a été détecté au site tumoral après 10 minutes, signal qui a pu être partiellement réduit par la co-injection d'un « inhibiteur de la MMP-2 » non identifié (aucun inhibiteur n'est complètement

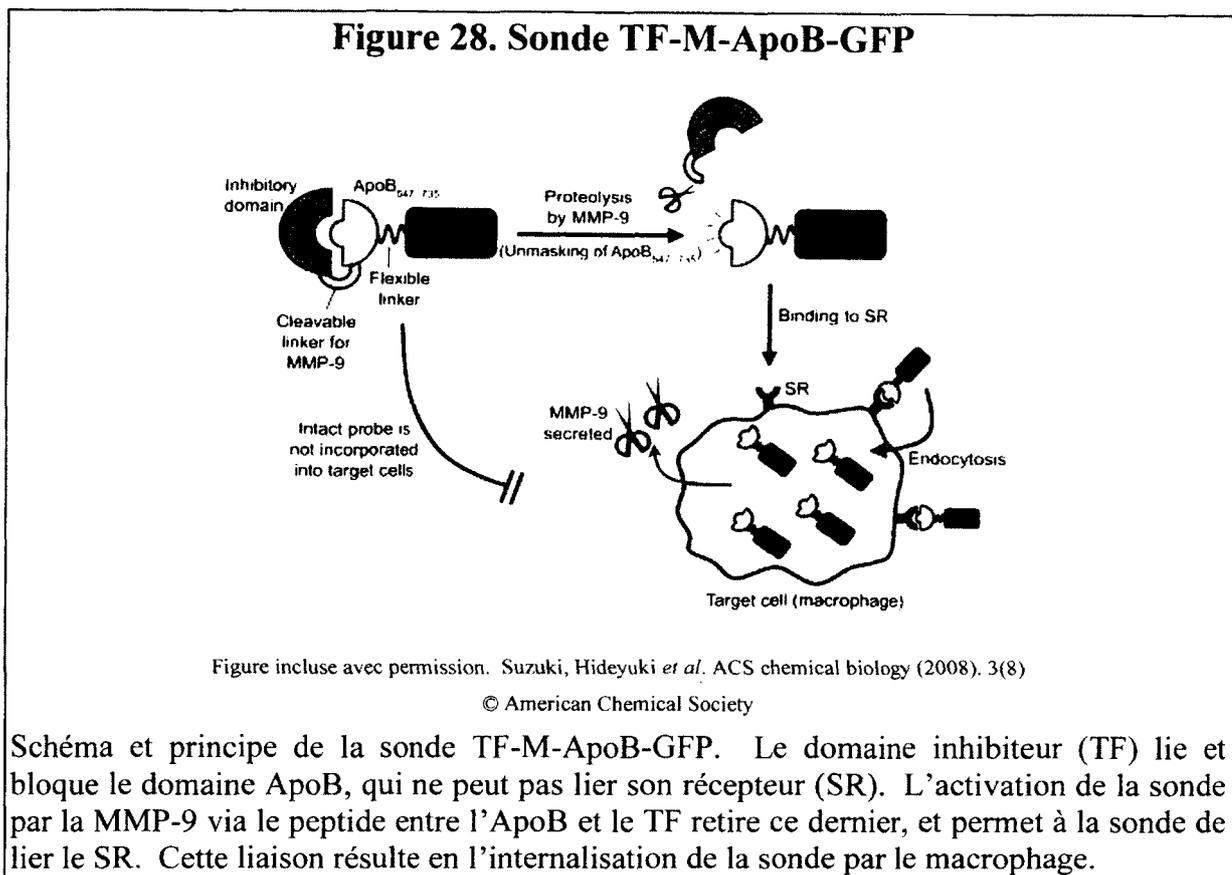
spécifique à la MMP-2). Bien que ces résultats préliminaires soient intéressants, le mode d'injection ne permet pas d'évaluer l'efficacité de la sonde pour le ciblage de tumeurs MMP-2 positives. De plus, un signal a été détecté même en présence d'inhibiteur – ce qui indiquerait que d'autres enzymes pourraient activer la sonde, ou que la dose de l'inhibiteur est insuffisante.



1.3.3.9 Sonde TF-M-ApoB-GFP

En 2008, une sonde synthétisée complètement en cellules a été publiée (Suzuki *et al.*, 2008). Cette protéine-sonde a été produite à l'aide de cellules BL21 transformées et incluait les domaines suivants : A) La protéine GFP (Green Fluorescent Protein), B) le domaine Apolipoprotéine B (ApoB), C) une séquence peptidique reconnue par la MMP-9, D) et un domaine consistant en la protéine chaperonne « Trigger Factor » (TF) (Fig. 29). Le domaine ApoB peut lier le récepteur de type scavenger (SR), mais le domaine TF empêche cette interaction. Les macrophages activés expriment le récepteur SR et sécrètent la MMP-9. Celle-ci active la sonde et retire le domaine TR, ce qui permet aux cellules de lier le fragment restant *via* le domaine ApoB et d'internaliser la sonde grâce au SR. Cette double reconnaissance permet d'augmenter la spécificité de la sonde pour les macrophages activés, comparativement aux macrophages dormants (pas de MMP-9). Leurs résultats en cellules sont sans équivoque et sont supportés par une batterie de contrôles avec différents

fragments de leur sonde, ainsi qu'une compétition de liaison aux récepteurs SR avec un inhibiteur spécifique : l'acide polyinosinique.



Leur sonde entrait dans les cellules lorsque les deux conditions étaient respectées : présence de MMP-9 et de récepteurs SR. Des comparaisons avec des macrophages humains dormants (MMP-9⁻, SR⁺) ou activés (MMP-9⁺, SR⁺) ont montré la nécessité de l'expression de la MMP-9. Les auteurs ont toutefois négligé de comparer l'internalisation de leur sonde dans un mélange de macrophages activés et non activés afin de vérifier à quel point leur sonde était spécifique. Étant donné la diffusion de la MMP-9 après sa sécrétion, il n'est pas exclus que la sonde soit activée n'importe où dans le milieu, avec comme résultat l'internalisation de la sonde dans toute cellule possédant le SR (principalement les macrophages). Une limitation possible, *in vivo*, serait l'activation pan-corporelle de la sonde par la MMP-9 présente dans le sang, et la liaison aux macrophages, peu importe leur niveau d'activation. Une autre limitation d'une telle sonde est le mode de synthèse, qui limite les variations du domaine signalétique aux protéines fluorescentes pouvant être

produites par les cellules. Les auteurs ont toutefois remplacé le domaine GFP par une luciférase avec succès, et leurs résultats ont indiqué que la bioluminescence était générée uniquement avec les cellules sécrétant la MMP-9 (homogénat cellulaire), ce qui pourrait pallier aux problèmes encourus en raison du fluorophore. Aucun résultat *in vivo* n'a été publié à ce jour.

1.3.3.10 Barbituriques fonctionnalisés avec Cy5.5

En plus d'être des sédatifs, les barbituriques sont des inhibiteurs de MMPs. Les équipes de Bremer et de Kopka (Faust *et al.*, 2008) ont évalué le potentiel de ces molécules pour l'imagerie optique des MMP-2 et -9. Un fluorophore (Cy5.5) a été lié à un barbiturique via une chaîne PEG₃. La mesure de l'IC₅₀ (concentration pour 50% d'inhibition) a montré que l'ajout de Cy5.5 provoquait une diminution l'efficacité de l'inhibition de la MMP-2 (IC₅₀ passe de 27 nM à 48 nM, une diminution de 46%). En incubant différents types cellulaire avec leur sonde *in vitro*, les auteurs ont prouvé que la molécule se liait aux cellules HT-1800 (MMP-2 ++, MMP-9 --) et aux cellules A-673 (MMP-2 ++, MMP-9 ++), mais pas aux cellules MCF-7 (MMP-2 -- et MMP-9 --). Une compétition avec le précurseur non fluorescent a éliminé complètement la liaison aux cellules. Un contrôle de compétition a permis de confirmer que le marquage était spécifique. Aucun test *in vivo* n'a été publié à ce jour.

1.3.3.11 CGS25966 et CGS27023A fonctionnalisés au Cy5.5

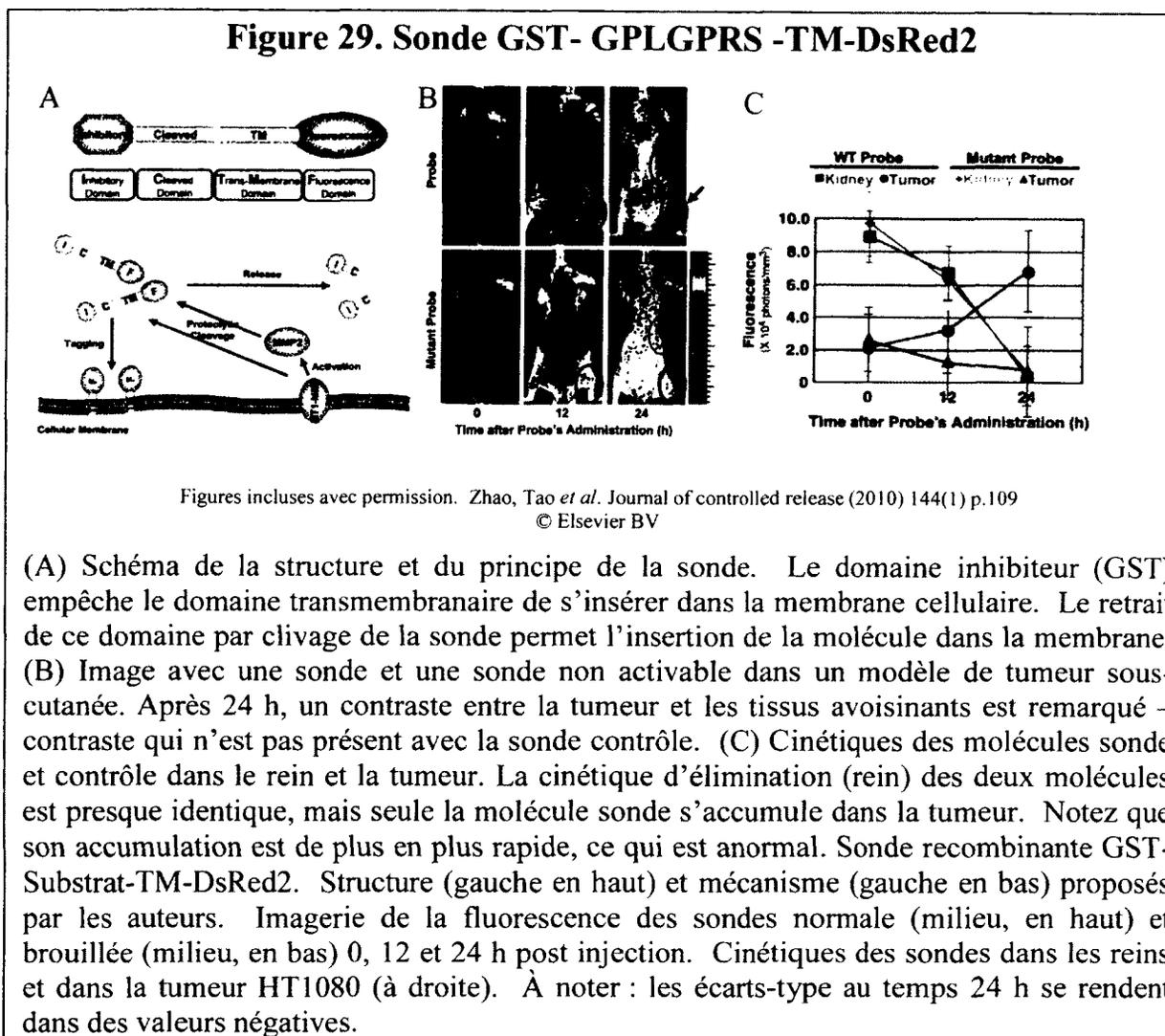
En 2009, le même groupe de recherche a synthétisé une sonde fluorescente dérivée des inhibiteurs de type hydroxalates CGS25966 et CGS27023A (Faust *et al.*, 2009). (*Rappel : En 2006, ces inhibiteurs avaient été dérivés afin de créer des sondes SPECT et TEP (Zheng et al., 2002; Fei et al., 2003; Wagner et al., 2006)*). En liant un Cy5.5 à l'inhibiteur via une chaîne PEG, les auteurs sont parvenus à créer une sonde fluorescente. Le précurseur (sans PEG ou Cy5.5) inhibe une variété de MMPs (1, 2, 3, 8, 9, 13) avec une affinité relativement élevée (IC₅₀ < 200 nM). La molécule complète était beaucoup moins efficace (MMP-2 et -9 ont été testées, avec IC₅₀ = 1600 et 1000 nM respectivement), indiquant que l'encombrement stérique induit par la fonctionnalisation serait débilisant pour la liaison à la cible. Les auteurs ont testé leurs sondes *in vivo* dans le même modèle que précédemment, mais n'ont pas effectué d'imagerie : ils ont plutôt excisé les tumeurs.

L'intensité du marquage des tumeurs était corrélée correctement avec l'activité détectée par zymographie et les quantités d'ARN_m mesurée par PCR quantitatif. À noter, la sonde marquait aussi les formes inactives des enzymes. Les auteurs ont conclu à une bonne co-localisation. Des résultats *in vivo* n'ont toujours pas été publiés.

1.3.3.12 GST-GPLGPRS-TM-[DsRed2] – Sonde recombinante avec liaison membranaire post-activation

L'équipe de Hiraoka a utilisé une nouvelle approche afin de cibler les MMPs : une sonde comprenant (a) une protéine fluorescente (DsRed2), (b) un segment transmembranaire (TM) emprunté au récepteur EGF, (c) un peptide substrat spécifique à la MMP-2 (GPLGPRS), et (d) un domaine de la glutathione-S-transférase (GST) (Fig. 30A) (Zhao *et al.*, 2010). En activant la sonde, la MMP-2 retire le domaine GST, ce qui permet au TM de s'imbriquer dans les membranes. Un intérêt de leur sonde est qu'elle est recombinante, c'est-à-dire qu'elle est synthétisée *in cellulo* puis purifiée, évitant ainsi les synthèses chimiques qui peuvent s'avérer longues et coûteuses. Les auteurs ont confirmé la spécificité de leur sonde contre les MMP-1, 3, 7, 9, 11 et 12. Bien qu'ils aient affirmé que leur sonde était complètement spécifique, leur résultats ont montré que les MMP 3, 9 et 12 avaient un potentiel d'activation équivalent à ~10%, ~20% et ~15% de celui de la MMP-2. Les auteurs ont confirmé le marquage des cellules par leur sonde à l'aide de la microscopie par fluorescence (en cellules). Les résultats *in vivo* en souris Balb/c nu/nu ont montré une accumulation spécifique de la sonde dans des tumeurs sous-cutanées HT1080 (MMP-2 +++) et dans des tumeurs MCF7 transfectées (plasmide MT1-MMP, cellules MT1-MMP ++), mais pas dans des tumeurs MCF7 transfectées avec un plasmide contrôle (MT1-MMP ---). La sonde contrôle non activable (brouillée) ne s'est pas accumulée dans les tumeurs HT1080. Il est intéressant de noter que bien que la sonde ait presque complètement été éliminée du sang au bout de 24 heures, elle s'accumulait davantage entre 12 et 24 h post injection qu'entre 0 et 12 h (Fig. 30B-C). Les cinétiques montrées dans l'article nous indiquent plutôt que l'accumulation était très progressive, et que même après élimination du sang, elle semblait poursuivre son accumulation dans les tumeurs.

Figure 29. Sonde GST- GPLGPRS -TM-DsRed2



(A) Schéma de la structure et du principe de la sonde. Le domaine inhibiteur (GST) empêche le domaine transmembranaire de s'insérer dans la membrane cellulaire. Le retrait de ce domaine par clivage de la sonde permet l'insertion de la molécule dans la membrane. (B) Image avec une sonde et une sonde non activable dans un modèle de tumeur sous-cutanée. Après 24 h, un contraste entre la tumeur et les tissus avoisinants est remarqué – contraste qui n'est pas présent avec la sonde contrôle. (C) Cinétiques des molécules sonde et contrôle dans le rein et la tumeur. La cinétique d'élimination (rein) des deux molécules est presque identique, mais seule la molécule sonde s'accumule dans la tumeur. Notez que son accumulation est de plus en plus rapide, ce qui est anormal. Sonde recombinante GST-Substrat-TM-DsRed2. Structure (gauche en haut) et mécanisme (gauche en bas) proposés par les auteurs. Imagerie de la fluorescence des sondes normale (milieu, en haut) et brouillée (milieu, en bas) 0, 12 et 24 h post injection. Cinétiques des sondes dans les reins et dans la tumeur HT1080 (à droite). À noter : les écarts-type au temps 24 h se rendent dans des valeurs négatives.

1.3.3.13 [Cy5.5]-MT1-AF7p, un peptide de haute affinité ciblant la MT1-MMP

En utilisant la méthode de « phage display », Zhu et collaborateurs sont parvenus à isoler un peptide (HWKHLHNTKTFL) possédant une haute affinité (K_d apparent de 0.0075 nM) pour un fragment de la MT1-MMP (Zhu *et al.*, 2011). Les auteurs ont ensuite procédé à une rationalisation de cette internalisation en utilisant la modélisation des deux molécules. Ils n'ont toutefois effectué aucun contrôle *ex vivo* avant d'injecter leur molécule marquée au Cy5.5 dans un modèle du cancer du sein (cellules MDA-MB-435 en sous-cutané) chez la souris femelle athymique, avec une tumeur de type A549 en contrôle négatif. Les auteurs ont observé une accumulation préférentielle de leur sonde dans les tumeurs MDA-MB-435, mais n'ont pas effectué de contrôle de perfusion.

1.3.3.14 MMPsense 680 et MMPsense 750 – Deux sondes commerciales à large spectre

La compagnie Visen Medical Inc. a été co-fondée par Weissleder en 2000, ce même chercheur qui a publié les premiers designs de sondes optiques ciblant les MMPs (Bremer *et al.*, 2001; Pham *et al.*, 2004). Visen Medical a développé une gamme de produits pour l'imagerie tomographique de fluorescence, incluant entre autres des sondes non activable et non spécifiques (AngioSense) et activable par plusieurs protéases (ProSense) ou par certaines MMPs (MMPsense) (Annexe III). En 2010, Visen Medical a été achetée par Perkin Elmer.

Parmi leurs produits, les sondes MMPsense 680 et 750 sont d'intérêt particulier pour cette thèse et récemment un nombre élevé d'études les utilisant dans différents modèles ont été publiés. Pour le bénéfice des lecteurs, cette thèse soulignera les points les plus importants de plusieurs de ces études, mais n'ira pas dans le détail. Toutefois, un soin particulier sera apporté à une étude publiée par l'équipe de V. Ntziachristos en 2009 (Baeten *et al.*, 2009).

Bien que la nature exacte de la sonde ne soit pas disponible, il est vraisemblable qu'elle soit basée sur (1) un groupement fluorophore lié via (2) une séquence reconnue et clivée par différentes MMPs à (3) un fluorophore identique qui est attaché à (4) un groupement référé en tant que groupe PKM, c'est-à-dire un groupement modifiant la pharmacocinétique.

Les sondes MMPsense sont activées par plusieurs MMPs, et minimalement par les cathepsines B et D (pour MMPSense 750 Fast, la vitesse d'activation est décroissante pour les MMPs $9 > 13 > 12 > 7 > 2 > 3$). Les poids moléculaires diffèrent entre les deux sondes (MMPSense 750 : 43 kDa, MMPSense 680 : 450 kDa), ce qui influe sur leur biodistribution et leur élimination, ainsi que sur les temps optimaux pour l'imagerie (6 h et 24 h, respectivement). Bien que l'efficacité de l'extinction de la MMPsense 680 n'est pas fournie, l'activation de la MMPSense 750 Fast résulte en une augmentation de signal par un facteur de 25 (PerkinElmer, 2012).

Alencar *et al.* (2007) ont évalué l'efficacité de la MMPSense 680 pour détecter les tumeurs CT2 implantées dans le colon de souris C57/Bl6. Grâce à un microcathéter, l'intérieur du colon a été inspecté, et les auteurs ont détecté un signal élevé au niveau des tumeurs. Le

contrôle négatif de cette étude a consisté en une image de la fluorescence intrinsèque (sans MMPsense) (Alencar *et al.*, 2007).

Wallis de Vries *et al.* (2009) ont utilisé la sonde MMPsense 680 (incubation *ex vivo*) afin de mettre en évidence les sites riches en MMP-9 d'un spécimen de carotide humaine provenant d'un sujet dont les symptômes indiquaient la présence de plaques athérosclérotiques. En comparant l'imagerie de la fluorescence après incubation avec la MMPsense et les résultats d'immunohistochimie et de zymographie, les auteurs ont confirmé partiellement la spécificité de l'activation de la sonde. Ces résultats ont démontré que, *ex vivo*, les enzymes présentes aux niveaux des sites des plaques étaient à même d'activer la sonde. Les auteurs ont aussi montré que la MMP-2 était en quantité très réduite et que la MMP-9 était probablement responsable de l'activation observée (Wallis de Vries *et al.*, 2009).

Klohs *et al.* (2009) ont utilisé la MMPsense 680 dans un modèle d'ischémie (occlusion de l'artère cérébrale médiane) chez la souris C57/Bl6 pour détecter l'activation des MMP-2 et 9. Les auteurs ont observé une augmentation de 40% du signal dans l'hémisphère ischémique comparativement à l'hémisphère contralatéral. Cette augmentation est passée à 20% lors de la co-injection de l'inhibiteur de MMP GM6001. Avec une sonde non activable (nature non discutée), l'augmentation de signal était de 12%. Ensemble, ces résultats indiquent que l'activation de la sonde est essentielle pour l'obtention d'un contraste élevé. Dans des animaux transgéniques MMP-9^{-/-}, l'activation était moindre, démontrant le rôle de cette enzyme dans la génération du contraste. Toutefois, les auteurs n'ont pas discuté de l'impact de ce knockout sur la réponse inflammatoire, vasculaire et tissulaire à l'infarctus, alors que la MMP-9 est impliquée dans ces réponses (Wang *et al.*, 2002). Aussi, dans leur modèle, les auteurs ont détecté une disruption de la barrière hémato-encéphalique : ce résultat indique qu'il est possible que l'augmentation du signal ait été partiellement due à l'accumulation non-spécifique de la sonde en conséquence de l'inflammation et de l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Klohs *et al.*, 2009).

Sheth *et al.* (2010) ont utilisé la sonde MMPsense 680 afin de mettre en évidence l'activité des MMP-2, -9, -12 et -13 dans un modèle d'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) chez le rat. Grâce à de l'imagerie de surface intravitale effectuée *via* un cathéter, les auteurs ont

obtenu des images leur permettant de différencier les animaux contrôles, les animaux souffrant d'AAA non traités ou traités avec de la doxycycline (inhibiteur de MMPs). Le signal observé reflétait très bien la progression et la taille de l'AAA. Toutefois, comme aucun contrôle de la vascularisation n'a été effectué, il est impossible d'éliminer la possibilité que l'accumulation ait été non-spécifique et causée par l'inflammation de l'aorte (Sheth *et al.*, 2010).

Evans *et al.* (2011) ont employé la MMPSense 750 dans un modèle murin d'arthrite avec ou sans traitement (APO866). Les auteurs ont corrélé l'histochemie et la progression de l'affliction, ainsi que l'expression des MMP-3 et 13 au niveau des articulations ciblées, avec le signal de la sonde. Le contrôle expérimental consistant en une cohorte d'animaux sans arthrite (Evans *et al.*, 2011) ne nous permet pas de commenter sur la spécificité du signal.

Yoon *et al.* (2011) ont testé la sonde MMPSense 680 dans un modèle de tumeur du colon induite chimiquement, ce qui leur a permis d'établir une forte corrélation entre l'intensité du signal fluorescent et la nature de l'affliction (inflammation, adénome ou adénocarcinome) tel que confirmée par histochemie. Toutefois, les auteurs n'ont effectué aucun contrôle de la distribution de la sonde (Sheth *et al.*, 2010).

Clapper *et al.* (2011) ont utilisé la sonde MMPSense 680 pour détecter les tumeurs de colon chez des souris Apc^{+/-Min-FCCC}. Les auteurs ont trouvé une corrélation élevée entre la présence de MMP-7 et le signal fluorescent (Clapper *et al.*, 2011), mais ont aussi formulé la remarque suivante:

"A thorough assessment of the underlying basis of the false-positive signals will be critical to increase the specificity of the next generation of MMP probes for the early detection of colon tumors."

Tel que mentionné ci-dessus, tous les articles de cette section ont un point en commun : aucune normalisation complète par rapport à l'accumulation non-spécifique des sondes n'a été effectuée. Toutefois, un article récent permet de mettre en lumière la proportion de signal spécifique auquel il est possible de s'attendre avec les MMPSense.

En 2009, l'équipe de Ntzachristos a utilisé la sonde MMPSense 680 lors de l'étude de l'expression de la MMP-9 dans un modèle murin de type *Her2/neu* développant spontanément des tumeurs mammaires (Baeten *et al.*, 2009). En parallèle, les auteurs ont aussi étudié l'expression des cathepsines (B, L, S, K, V et D) à l'aide de la sonde ProSense 750. Dans les deux cas, les auteurs ont co-injecté une sonde contrôle, la AngioSense 750 (pour la MMPSense 680) ou la AngioSense 680 (pour la ProSense 750), qui s'accumulent de manière non-spécifique grâce à l'effet EPR. Leur objectif était simple : montrer qu'un contrôle de la captation tissulaire permet de prendre en compte l'apport non-spécifique d'une sonde dans la détection d'une cible moléculaire, et de corriger le signal mesuré. Les auteurs ont souligné que les sondes tests et contrôles devraient posséder une biodistribution similaire, mais aucun argument concret en ce sens n'est amené (les sondes ont des masses moléculaires différentes, 250 kDa pour AngioSense, 43 kDa pour MMPSense 680). Toutefois, le contrôle a tout de même fourni une approximation de premier ordre quant à l'accumulation des macromolécules dans les tissus. Les résultats sont présentés à l'annexe IV. La démonstration incluse dans l'annexe montre que lorsque le signal obtenu est corrigé pour la captation non spécifique, le signal spécifiquement lié à l'activation des sondes n'est pas très important. De plus, les résultats bruts indiquent que l'intensité du signal obtenu pour chaque sonde (AngioSense, MMPSense et ProSense) est similaire. Cela signifierait qu'une proportion importante des molécules ProSense et MMPSense est activée – peu importe le tissu dans lequel elles se trouvent.

1.4 Contexte et énoncé de thèse

Depuis 2001, de nombreuses publications ont fait état de nouveaux radiotraceurs, de sondes optiques ou d'agents de contraste capables de cibler une ou quelques MMPs. Toutefois, aucune n'est destinée à imager la MMP-2 seule, ou du moins cette spécificité n'a jamais été confirmée adéquatement. Bien que certaines sondes soient destinées aux MMP-2 et -9 (Chen *et al.*, 2005), ces MMPs peuvent jouer des rôles opposés dans certaines pathologies (Overall et Kleinfeld, 2006). Il est donc important de pouvoir déterminer l'activité individuelle de la MMP-2.

L'objectif de cette thèse est de détecter et quantifier l'activité de la MMP-2 *in vivo*, par IRM ou par fluorescence, et ce de manière non invasive. La sonde doit être spécifique et

générer un signal ou un contraste suffisant pour pouvoir quantifier l'activité de l'enzyme. Les sous-objectifs sont de :

- Confirmer le mécanisme d'activation des molécules utilisées (confirmer le changement de solubilité du CdS et l'augmentation de la fluorescence pour les sondes fluorescentes).
- Confirmer *in vitro* la sélectivité des molécules testées pour la MMP-2 comparativement aux MMPs 9, 3 et 7 qui possèdent un site actif similaire.
- Confirmer *in vivo* la spécificité du signal observé dans un model animal en utilisant les contrôles appropriés (molécules non activable)

Notre hypothèse initiale était qu'un agent de contraste CdS pourrait nous permettre de détecter et de quantifier la MMP-2, et les résultats obtenus ont permis la rédaction du manuscrit 1. Toutefois, en vertu de nos résultats, nous en sommes venus à la conclusion que l'IRM ne nous permettrait pas d'effectuer les expériences contrôles nécessaires à la quantification. Pour cette raison, nous avons ensuite posé l'hypothèse qu'une sonde fluorescente activable avec fluorophore contrôle (similairement à celle développée par Scherer et collaborateurs (Scherer *et al.*, 2008)) nous permettrait d'atteindre notre objectif. En cours de développement des sondes, nous nous sommes heurtés à plusieurs problèmes, dont l'agrégation de nos nouvelles molécules. Les résultats qui ont été obtenus ont tout de même été publiés et font l'objet du manuscrit 2. Malgré leur apparente sélectivité *in vitro*, les molécules développées dans les deux premiers manuscrits ne sont pas aptes à remplir leur rôle. Les contrôles appropriés nous ont permis de voir que ces molécules génèrent peu de signal spécifique *in vivo*, surtout lorsque comparé à la captation non spécifique.

Hors du cadre initial de ce projet principal, nous avons effectué des tests avec une sonde non spécifique et non reliée nommée QEPR-1.8 dans le cadre d'une collaboration avec la compagnie Quidd. Bien que ce projet ait eu un objectif différent de ceux énumérés ci-haut, les résultats obtenus nous permettent de critiquer une portion importante de la littérature concernant l'imagerie des MMPs. L'évaluation de QEPR-1.8 dans un modèle de radiothérapie permet de clairement démontrer l'impact des variations de captation non

spécifique dans un modèle tumoral. Les résultats de ce projet sont décrits dans le manuscrit 3.

Afin d'introduire et de lier les manuscrits, le chapitre 2 présente des résultats obtenus avant, entre et après ceux présentés dans les articles constituant cette thèse. Les chapitres 3, 4 et 5 sont les trois manuscrits préparés dans le cadre de ces travaux. La discussion du chapitre 6 est une dissertation sur les contrôles utilisés dans la littérature, les contrôles utilisés par notre groupe, et les informations qu'il est possible ou impossible d'en tirer.

Chapitre 2. Résultats et introduction aux travaux publiés

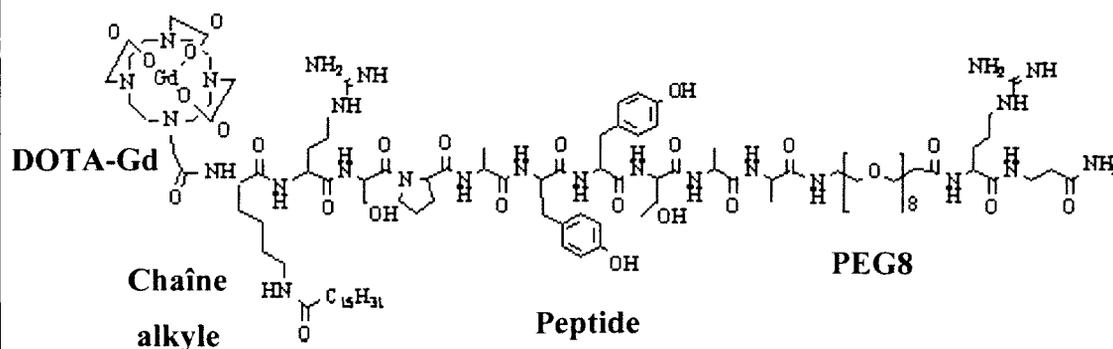
Pour le bénéfice du lecteur, il est suggéré de prendre connaissance des chapitres 3, 4 et 5 au moment où ces derniers sont introduits au cours du chapitre 2. Ceci lui permettra de suivre le fil chronologique des travaux discutés.

2.1 Développement et évaluation de molécules avec commutateur de solubilité

Afin de modifier le signal observé par IRM, il est nécessaire qu'un agent de contraste soit présent en concentration très élevée dans un voxel ($>10^{-5}$ M). Un ciblage 1 pour 1 (p. ex. anticorps-cible) n'est pas une option, puisque dans le cas des MMPs (et de la plupart des enzymes et récepteurs), les concentrations de cible attendues sont de l'ordre de $<10^{-7}$ M et moins. Ainsi, pour amplifier le contraste généré, il est nécessaire de se baser sur une activation enzymatique. Dans ce cadre, chaque molécule (enzyme) cible peut activer une quantité élevée d'agent de contraste. Il existe quelques travaux proposant des approches d'activation où la relaxivité d'un agent de contraste est modulé par le retrait d'une portion de ce dernier. Toutefois, la chimie d'un tel mécanisme est un travail ardu en soit, quoiqu'il en existe quelques exemples dans la littérature. Plutôt, une stratégie plus simple à implémenter a été sélectionnée : l'utilisation d'une molécule avec CdS. Les molécules CdS sont simples à synthétiser et à préparer, et si le CdS est efficace, elles peuvent théoriquement générer un contraste similaire aux molécules dont à relaxivité modulable. Le prof. Lepage possédant déjà une expertise concernant ces molécules, elles ont été sélectionnées pour la conception de l'agent de contraste ciblant la MMP-2.

L'auteur de cette thèse a débuté son projet de recherche un peu après la synthèse des premières molécules avec CdS (section 1.3.2.1). Durant l'année 2007, la première version de notre agent de contraste (Fig. 31) a été synthétisée. Cette molécule ressemble beaucoup à l'agent développé par Lepage *et al.* (2007) et possède une chaîne alkyle latérale et un groupement PEG dont le rôle respectif est de réduire et d'augmenter la solubilité aqueuse de la molécule. Après activation, la section PEG est retirée, réduisant la solubilité de l'agent. La molécule a été testée dans quelques animaux ($n = 3$). Bien que les résultats nous aient donné un certain espoir, les souris sont mortes par embolie pulmonaire (vérifiée par nécropsie, résultats non montrés). Nous avons posé l'hypothèse que l'agent non activé (initial) était trop hydrophobe, et nous avons tenté de l'améliorer. L'évaluation de la seconde itération de l'agent *in vivo* nous a permis de publier le premier manuscrit présenté dans cette thèse (PCA2-switch). Le lecteur est référé au Chapitre 3 pour les résultats.

Figure 30. Structure des molécules avec commutateur de solubilité

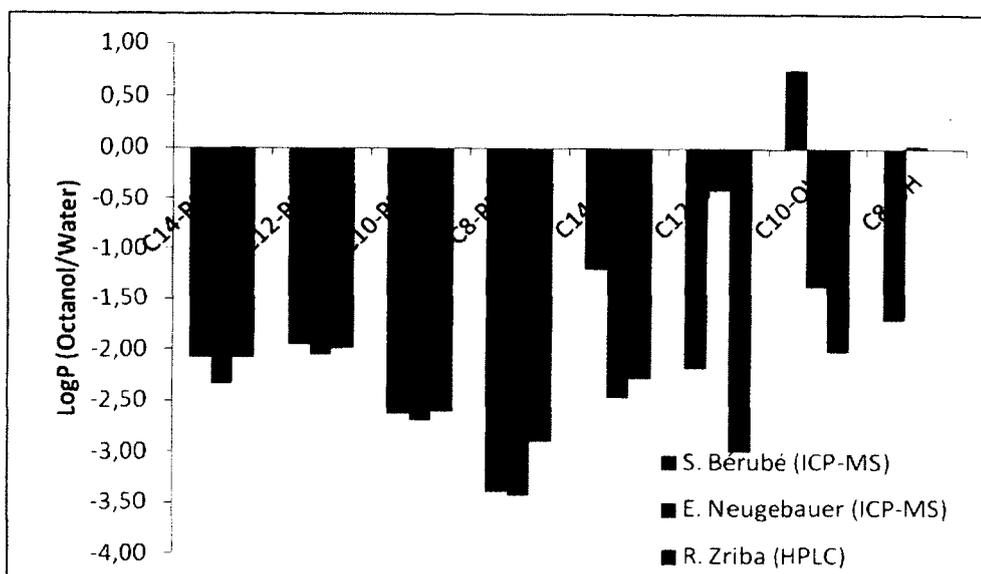


Structure de la molécule JB-24, première molécule à commutateur de solubilité testée. Cette molécule comprend un peptide pouvant être clivé par la MMP-2 entouré par un PEG8 (augmente la solubilité) et une chaîne alkyle (réduit la solubilité). Le groupement DOTA permet de lier un atome de Gd³⁺, responsable de la génération de contraste en IRM. Le clivage de cette molécule réduit la solubilité de la portion contenant le DOTA-Gd.

Toutefois, nous n'étions pas complètement satisfaits du contraste généré : la différence observée entre les tumeurs était trop faible, et nous désirions que ce dernier persiste plus longtemps dans l'animal. Pour ce faire, nous avons tenté d'améliorer le commutateur de solubilité en changeant la taille de la chaîne alkyle, et en ajoutant des groupements PEG supplémentaires. Il est à noter que l'efficacité du commutateur de solubilité n'avait jamais été évaluée d'autre manière que par les différences de temps de rétention sur le HPLC (Chromatographie d'affinité – sur une colonne C₁₈ (hydrophobe)). Or, nous voulions établir une méthode plus rapide et nous permettant de comparer approximativement le potentiel en tant que commutateur de solubilité d'un nombre important de molécules sans devoir recourir à des essais *in vivo*.

Pour ce faire, nous avons évalué nos molécules en utilisant deux méthodes : en mesurant leur coefficient de partition octanol/eau (Fig. 32) et leur propension à lier des cellules *in vitro* (Fig. 33).

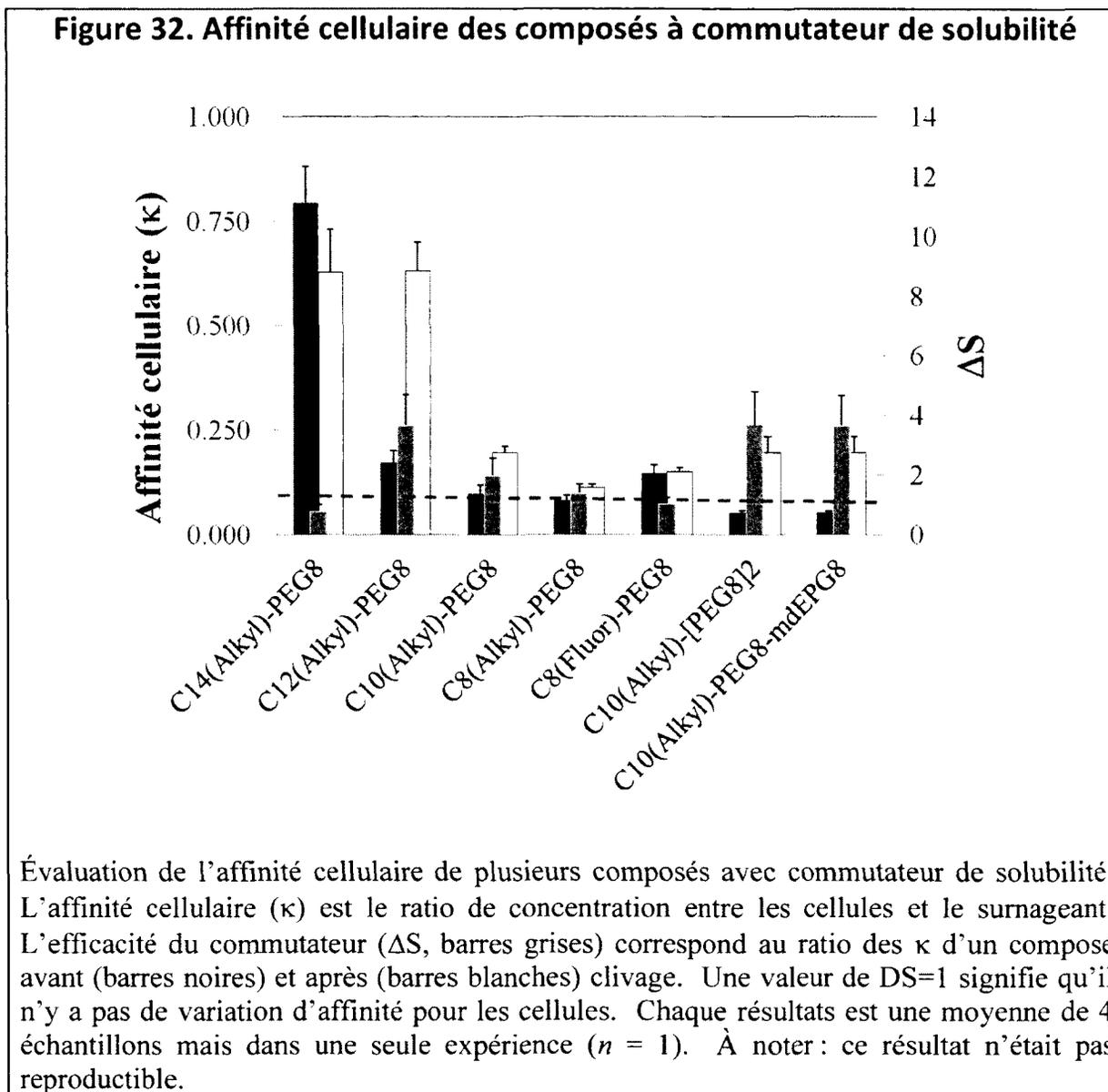
Figure 31. Évaluation du coefficient de partition octanol/eau des composés à commutateur de solubilité



Évaluation du coefficient de partition octanol/eau (LogP) de quatre composés comprenant différentes longueurs de chaînes alkyle (CX, ou X est le nombre de carbones), et ce avant (PEG8) et après (OH) activation.

Notre équipe s'est heurtée à plusieurs problèmes durant la mise au point de cette méthode et l'optimisation pour la préparation des échantillons a nécessité de nombreuses tentatives. Par exemple, les molécules ont été dosées soit par ICP-MS (induced coupled plasma – mass spectroscopy) ou par HPLC (détection par absorbance). L'ICP-MS a été conduite dans deux laboratoires différents et de manière indépendante. Bien que les composés non clivés (C14-PEG, C12-PEG, C10-PEG, C8-PEG) donnent des résultats similaires, le dosage des fragments clivés (C14-OH, C12-OH, C10-OH, C8-OH) ne permet pas d'obtenir une idée claire de leur LogP. Ceci nous indique que les propriétés intrinsèques de ces fragments nuisent à leur dosage, que ce soit par ICP-MS ou par HPLC. Le protocole est répertorié à l'annexe V. En parallèle, nous voulions évaluer si nous pouvions utiliser des cellules vivantes afin d'évaluer l'efficacité du commutateur *in vitro*. Afin de simuler les conditions *in vivo* ou l'agent serait en contraste avec les cellules compactées dans un tissu, nous avons mis les différentes molécules synthétisées en contact avec des concentrations élevées de cellules, nous avons obtenu les résultats présentés à la Fig. 33. Nous ne tentions pas ici

de définir le type d'interaction présent, mais uniquement de vérifier si une interaction survenait. Il est à noter que ces résultats ne semblaient pas reproductibles, mais la figure est montrée ici comme exemple d'analyse.



Après avoir investi quelques mois en tentatives infructueuses, notre équipe a laissé de côté le développement de ce type de molécules. Bien qu'il soit difficile d'évaluer l'impact que cela a pu avoir, nous avons découvert en 2011 (deux années plus tard) que le dosage du Gd^{3+} à l'ICP-MS est problématique. Or, toutes nos mesures reposaient sur ce dosage. Bien que la cause exacte de ces problèmes de dosage n'ait pas été identifiée, il semble que le

Gd³⁺ ait tendance adhérer à la tubulure de l'appareil, et donc à contaminer la lecture des échantillons suivants (communication personnelle avec Serge Bérubé, technicien responsable de l'opération de l'ICP-MS du département de génie environnemental, Université de Sherbrooke).

2.2 PCA2-switch – critique et justification de la réorientation du projet vers l'optique

Grâce à l'agent PCA2-switch, il a été possible de différencier entre deux tumeurs sous-cutanées avec des niveaux élevés (MC7-L1 WT) ou modérés (MC7-L1 MMP-2 « knockdown ») (KD) de MMP-2. Il est à noter que, malgré une importante différence des niveaux de MMP-2 activée *in vitro*, une activité MMP-2 non négligeable était présente dans les tumeurs MMP-2 KD *in vivo*. Cette activité peut être associée aux cellules stromales et immunitaires présentes dans la tumeur, qui produisent ou induisent la production de la MMP-2 (Zhou *et al.*, 1993; Leppert *et al.*, 1995; Szabo *et al.*, 2004). Ceci est peu discuté dans la littérature de l'imagerie spécifique des MMPs, mais il s'agit pourtant d'un facteur confondant inhérent à tous les modèles tumoraux. En effet, les tumeurs induisent souvent une inflammation et le recrutement des cellules immunitaires pouvant produire une batterie de facteurs et d'enzymes.

Le signal obtenu avec PCA2-switch consiste en une différence de pharmacocinétique. L'agent PCA7-switch (Lepage *et al.*, 2007) avait permis d'obtenir des résultats similaires - indiquant que le principe de commutateur de solubilité est probablement fonctionnel. Toutefois, dans les deux cas, le contraste entre les tumeurs, c'est-à-dire la différence de cinétique observée, n'a pas fourni suffisamment d'information pour quantifier l'enzyme ciblée. En fait, même un diagnostic semi-quantitatif (beaucoup ou peu de MMP-2) serait difficile à établir sans référence, par exemple une tumeur contrôle possédant des propriétés identiques mais avec une expression de MMP-2 connue. Et dans ce cas, il serait tout de même essentiel de procéder à un contrôle de la captation non spécifique des tumeurs, car ces dernières peuvent différer au niveau de leur vascularisation.

Ce contrôle requiert la possibilité de faire le suivi en même temps ou peu de temps avant ou après avec une sonde inactivable possédant les mêmes composantes. La demi-vie

biologique des molécules PCA2-switch et PCA2-scrambled étant de plus d'une heure, la possibilité d'effectuer deux expériences en succession était difficile puisque l'anesthésie des animaux est limitée. Comme il est impossible de mesurer la concentration de deux agents de contraste co-injectés, nous avons plutôt orienté la partie suivante du projet vers l'imagerie optique.

2.3 Développement de sondes fluorescentes activables spécifiques à la MMP-2

Nous avons sélectionné les groupements Cy5 et QSY21 pour bâtir une série de sondes fluorescentes sélectives à la MMP-2 avec des émissions ciblées pour du FRET (voir section 1.2.4.4). À l'instar des agents PB-1 et PB-2 présentés dans l'introduction (McIntyre *et al.*, 2004; Scherer *et al.*, 2008), nous avons initialement ajouté un groupement fluorescent de référence (Fluorescéine/FITC) à notre molécule afin de pouvoir évaluer directement la perfusion des tissus et normaliser le signal de nos sondes.

Nous avons préparé une molécule pour laquelle le groupement Cy5 (Fluorophore) se trouve à proximité du QSY21 (atténuateur) alors que le FITC (Fluorophore de référence) est localisé un peu plus loin (Fig. 35). L'efficacité du FRET entre un fluorophore et un groupement atténuateur est basé sur 1) la distance entre les groupements, 2) la superposition des spectres d'émission du fluorophore et du spectre d'absorption de l'atténuateur et 3) l'orientation des moments dipolaires d'émission et d'absorption. Le FITC n'a que très peu de recouvrement spectral avec le QSY21 ou avec le Cy5, ce qui en faisait un choix logique comme fluorophore de référence (Fig. 35A). À noter, le premier choix de fluorophore contrôle était le Cy7 (coefficient d'extinction des tissus minimal *in vivo* à 780 nm), mais étant donné le coût de ce dernier, nous avons sélectionné le FITC pour débiter nos tests. Le protocole et les conditions utilisés pour tester nos sondes sont rapportés à l'annexe VII.

L'activation des sondes par de la MMP-2 commerciale dans un tampon aqueux est suivie grâce à l'augmentation de leur fluorescence. Les résultats obtenus avec le premier modèle de sonde ont été décevants : l'atténuation du Cy5 n'était que d'environ 78%, et une

atténuation de 46% du FITC a été mesurée. Nous avons essayé d'éliminer l'atténuation du FITC en synthétisant deux nouvelles versions de la sonde et en jouant sur deux des paramètres de l'efficacité du FRET : nous avons éloigné le FITC du QSY21 (Fig. 35B) et nous avons par la suite remplacé carrément le FITC par un groupement amino-méthyl-coumarine (AMC), dont le spectre d'émission se situe à des longueurs d'onde plus courtes, et donc moins absorbées par le QSY21. Les résultats (Fig. 36) obtenus avec ces deux itérations sont similaires à ceux obtenus avec le premier modèle: l'activation des sondes cause une augmentation du signal des deux fluorophores, soit le Cy5 et le FITC ou l'AMC, nous indiquant que nous avons fait fausse route.

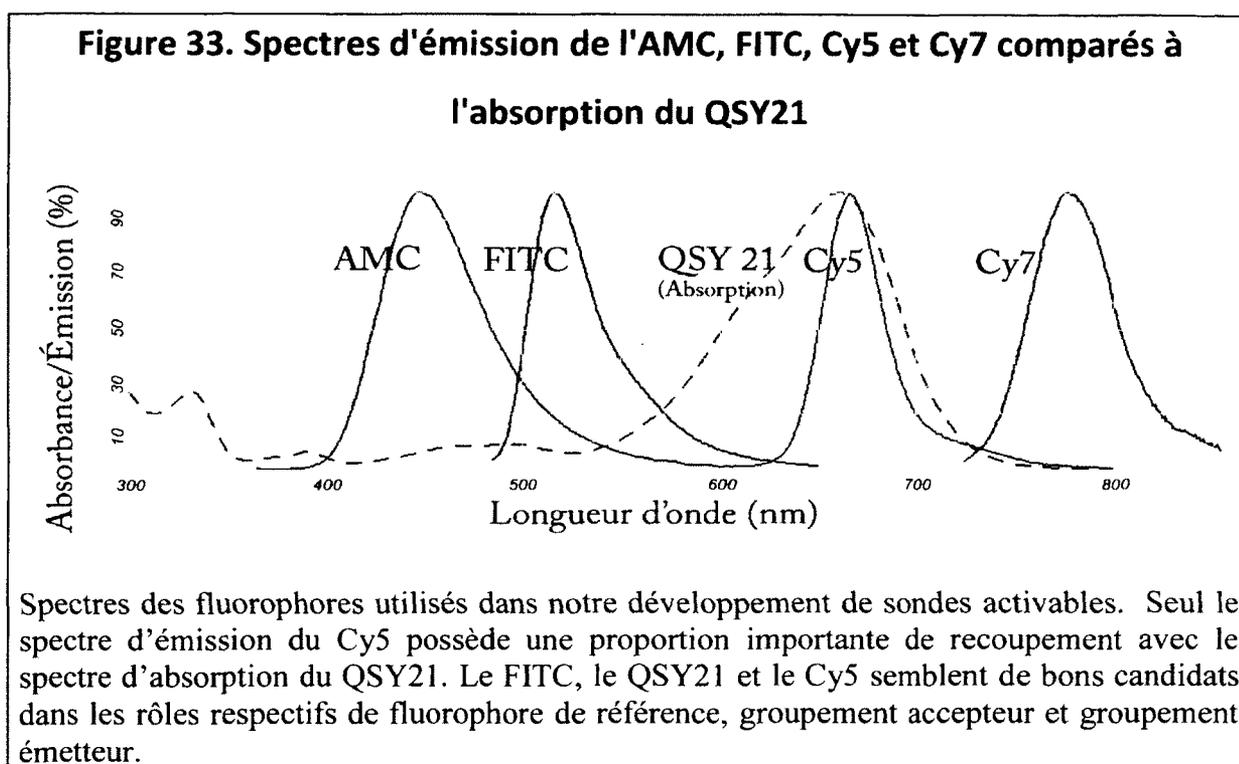
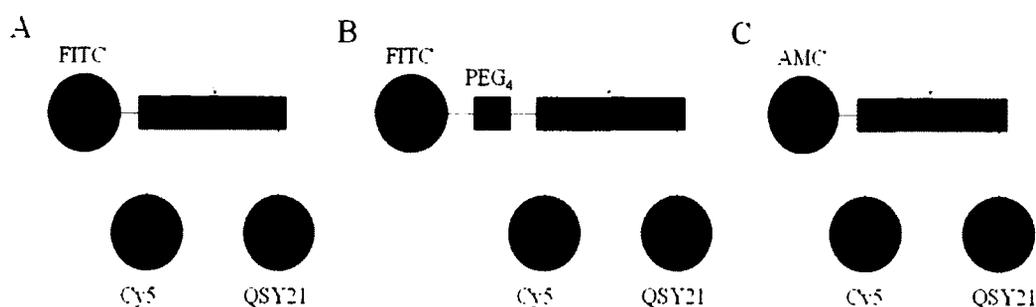
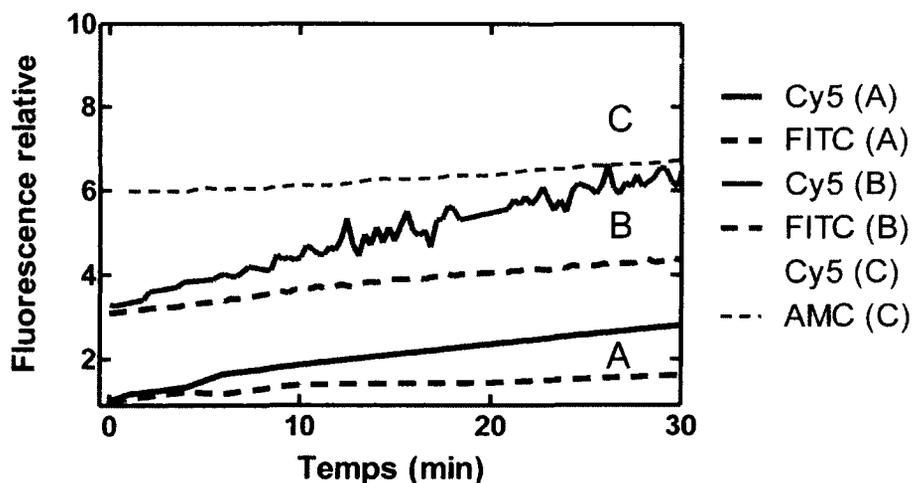


Figure 34. Structures des composés bi-fluorescents



Design initial des sondes activables. (A) Sonde MMP-2 PAFP. Les résultats obtenus avec cette première version nous indiquent que la fluorescence contrôle (FITC) varie lors de l'activation de la sonde. Afin de diminuer ce phénomène, deux autres sondes sont synthétisées. (B) L'itération suivante comprend un groupement PEG₄ dont le rôle est d'éloigner le groupement FITC du groupement QSY21, ce qui aurait pour effet de diminuer l'effet FRET résiduel. (C) La dernière itération est une ultime tentative : en changeant le FITC pour l'AMC, la superposition entre l'absorbeur et l'émetteur diminue, ce qui devrait minimiser l'efficacité du FRET.

Figure 35. Signal lors de l'activation avec les sondes bi-fluorescentes



Résultats avec les sondes présentées à la Fig. 35. Les courbes sont décalées vers le haut (B : 2.5 unités et C : 5 unités) pour faciliter la visualisation.

Il est à noter que durant cette période, nous dosions les sondes par leur poids, une méthode qui s'est éventuellement révélée erronée. Aussi, nous préparions des solutions aqueuses concentrées des sondes – ce qui, à la lumière de nos déductions du second manuscrit, n'était pas adéquat. Plutôt, il est préférable de quantifier les sondes grâce à leur absorbance dans le méthanol, et d'éviter de le faire dans les milieux aqueux où elles ont tendance à agréger, ce qui modifie leurs propriétés optiques (voir Chapitre 4).

En parallèle avec ces essais, nous avons étudié le comportement de la sonde B en solution aqueuse (Fig. 37). Nos conclusions sont que la suspension des sondes dans le DMSO avant leur dilution dans un tampon aqueux augmentait grandement le signal observé pour le FITC, mais n'affectait pas visiblement le signal du Cy5. Suite à ces résultats, nous avons abandonné l'idée d'inclure un fluorophore contrôle sur la sonde afin de concentrer nos efforts sur le développement de sondes fluorescentes activables par la MMP-2. Le deuxième manuscrit décrit ce cheminement – le lecteur est référé au Chapitre 4 pour ces résultats.

Grâce à une caractérisation poussée de nos molécules comprenant un groupement Cy5 et un groupement QSY21, nous avons déterminé que le QSY21 induisait l'agrégation des sondes. Ceci n'est pas nécessairement étonnant, puisque le QSY21 seul a tendance à mal se solubiliser dans les tampons aqueux. L'impact de cette agrégation sur l'absorbance et la fluorescence du groupement Cy5 a été initialement déroutant. Fort heureusement, un article portant sur l'interaction de groupements Cy5 liés à un polymère nous a permis d'identifier le phénomène comme étant de l'agrégation hypsochromique, soit une interaction des fluorophores modifiant les propriétés optiques de ces derniers. Ce phénomène n'avait jamais été mentionné dans le domaine de l'imagerie optique de fluorescence, et est peu discuté en général dans la littérature.

À la lumière de ces observations, il est aisé de comprendre *a posteriori* nos résultats avec les sondes bi-fluorescentes. La dimérisation des sondes permettait à deux groupements FITC (ou AMC) de se rapprocher suffisamment pour causer une auto-extinction. Tel que mentionné dans l'introduction (section 1.3.3), l'auto-extinction est utilisée dans la littérature pour construire des sondes activables, mais les fluorophores sont habituellement

regroupés sur un polymère pour faciliter ce rapprochement (Bremer *et al.*, 2001; McIntyre *et al.*, 2004; Scherer *et al.*, 2008). L'activation de nos sondes fluorescentes devait donc séparer les groupements FITC/AMC, qui sans le QSY21, ne pouvaient plus agréger. L'agrégation expliquerait aussi le manque de reproductibilité de nos essais initiaux qui ont beaucoup retardé la caractérisation de ces molécules : l'agrégation est un phénomène variant entre autres avec le temps, la température et la concentration. La dissolution de nos sondes était initialement effectuée dans un tampon aqueux avec pour conséquence l'apparition d'agrégats, qui se dissolvaient plus ou moins en fonction de l'agitation des solutions. Finalement, la faible augmentation de fluorescence mesurée (5 fois) pour le fluorophore Cy5 est possiblement due à l'incapacité de l'enzyme à activer les sondes fortement agrégées.

Suite à nos observations, nous avons préparé nos sondes à faible concentration en solution aqueuse, alors que les solutions mères à haute concentration étaient préparées à l'aide de DMSO, un solvant organique polaire, qui solubilise des nombreux composés et empêche la dimérisation. Il faut prendre en compte que même à concentration réduite, la dimérisation des sondes se produit – et ceci a été démontré durant nos tests de dilution de la sonde **I** (voir manuscrit). Nous avons aussi observé que le signal de la sonde **I** doublait lorsqu'elle était mélangée au plasma, tandis que le signal de la sonde **II** demeurait inchangé. Ceci confirme que lorsque **I** était mis en présence de partenaires de liaison non spécifiques potentiels, comme l'albumine, une partie de son agrégation était perdue. Ce n'était pas le cas pour la sonde **II**. Nous pouvons donc affirmer que la sonde **II** agrégeait plus fortement que la sonde **I**.

Étant donné que les agrégats H n'étaient pas fluorescents, une variation de l'agrégation H causait forcément une variation du signal de nos sondes. Ceci expliquerait pourquoi la dissolution de la sonde **I** dans du plasma (comprenant de l'albumine), provoquait automatiquement sa désagrégation et l'augmentation de sa fluorescence. Ce n'était pas le cas pour la sonde **II**, qui agrégeait plus solidement. La molécule **II** est alors devenue un candidat plus intéressant pour des études *in vivo*, puisqu'elle demeurera agrégée, minimisant ainsi le bruit de fond visible dans l'animal comparativement à la sonde **I**.

2.4 Détection de la MMP-2 par imagerie optique avec une sonde fluorescente activable

2.4.1 Planification et vue d'ensemble des résultats

Bien que non discuté dans le second manuscrit, nous avons évalué les sondes *I*, *II* et *III* *in vivo* dans un modèle murin de tumeurs sous-cutanées (même modèle que dans le premier manuscrit). Nous les avons comparées avec des sondes contrôles, qui étaient synthétisées avec une séquence peptidique brouillée (*I*-s) ou en acides aminés D (*II*d et *III*d). Nous avons de plus effectué un contrôle de la perfusion des tumeurs avec le composé *V*, qui était la fraction fluorescente de la sonde une fois activée par la MMP-2. Le déroulement des tests a été effectué tel que décrit au Tableau 4. Des images représentatives sont présentées à la Fig. 35.

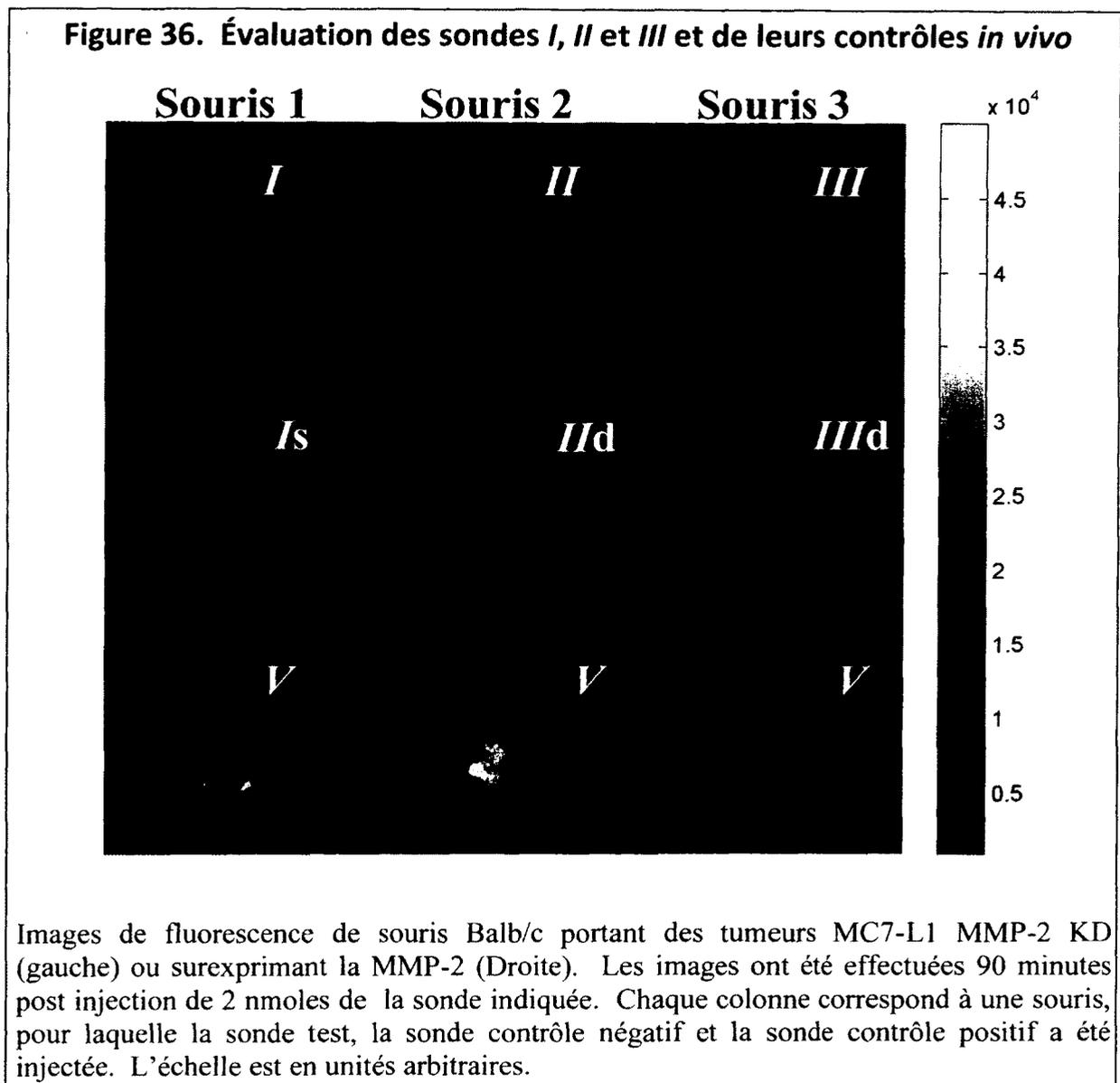
De manière générale, les sondes testées étaient activées partout dans l'animal – ou du moins, elles étaient activées au niveau de la peau de manière prononcée. La comparaison des intensités entre *I*, *II*, *III* et le contrôle positif *V* a suggéré que 90 minutes après l'injection, la sonde était activée à environ 40-50%. De plus, le contraste entre les tumeurs et la peau était similaire avec les sondes et le contrôle de perfusion – et aussi similaire à ce qui est retrouvé dans la littérature (ratio 1.5 à 2x) (Groves *et al.*, 2012).

Tableau 4. Planification des essais *in vivo* des sondes *I*, *II* et *III* et de leurs contrôles négatifs (*I*s, *II*d, *III*d) et positif (*V*).

Jour	Souris					
	1	2	3	4	5	6
J1	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>
J3	<i>I</i> s	<i>II</i> d	<i>III</i> d	<i>I</i> s	<i>II</i> d	<i>III</i> d
J6	<i>V</i>	<i>V</i>	<i>V</i>	<i>V</i>	<i>V</i>	<i>V</i>
J9	<i>II</i>	<i>III</i>	////	////	<i>I</i>	////
J11	<i>II</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>I</i>	<i>III</i>	<i>I</i>

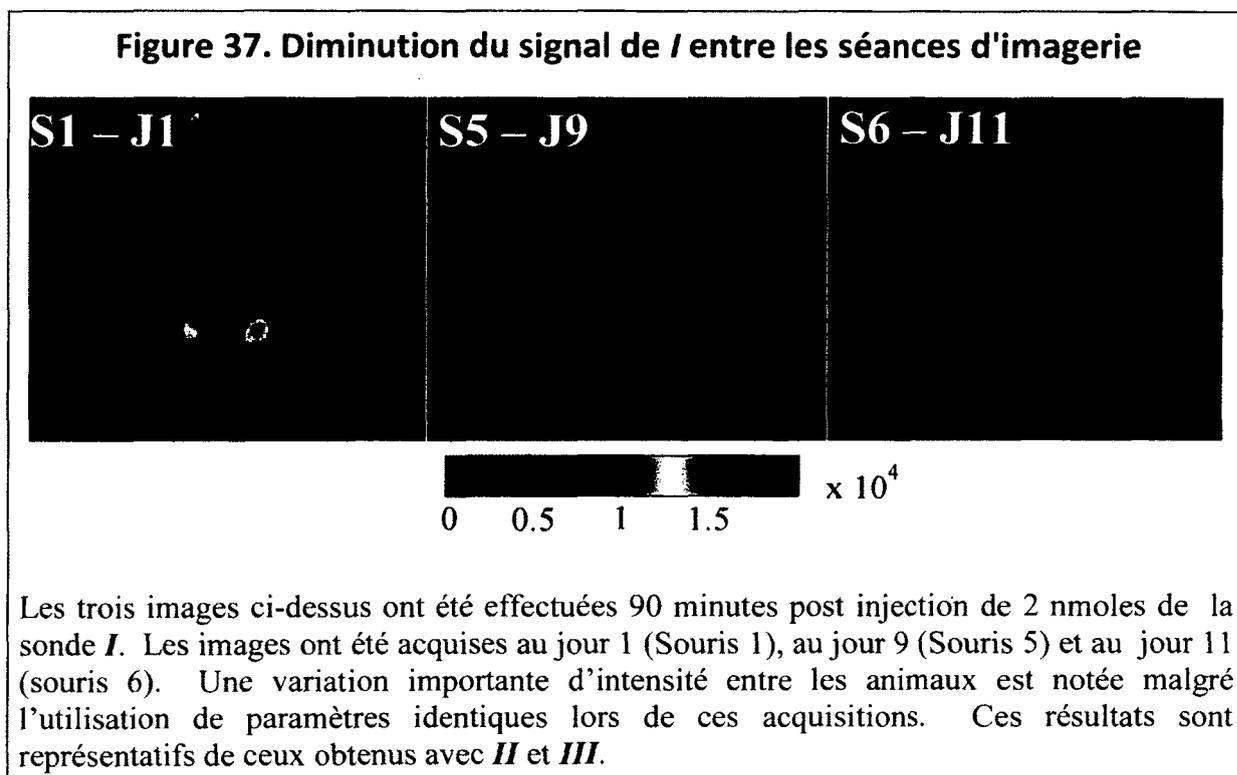
Répartition des essais des sondes fluorescentes. Certaines sondes ont été testées à plusieurs reprises dans le même animal pour vérifier la reproductibilité de l'essai. Un contrôle de la perfusion a été effectué chez toutes les souris au jour 6. Les contrôles négatifs ont été effectués uniquement au jour 3. Une dissection a été effectuée après le scan au jour 11.

Nous avons aussi constaté que le contrôle d'activation brouillé *Is* était davantage activé que les sondes tests, nous indiquant que ce contrôle était extrêmement mauvais – et jetait un doute sur la validité des contrôles brouillés utilisés dans le cadre de nos sondes à commutateur de solubilité. Davantage d'essais seront nécessaires pour confirmer ce résultat, car *Is* a été testé dans un nombre limité d'animaux ($n = 2$). De plus, étant donné la nature différente des deux molécules, un parallèle entre PCA2-scrambled et *Is* n'est pas nécessairement valide.

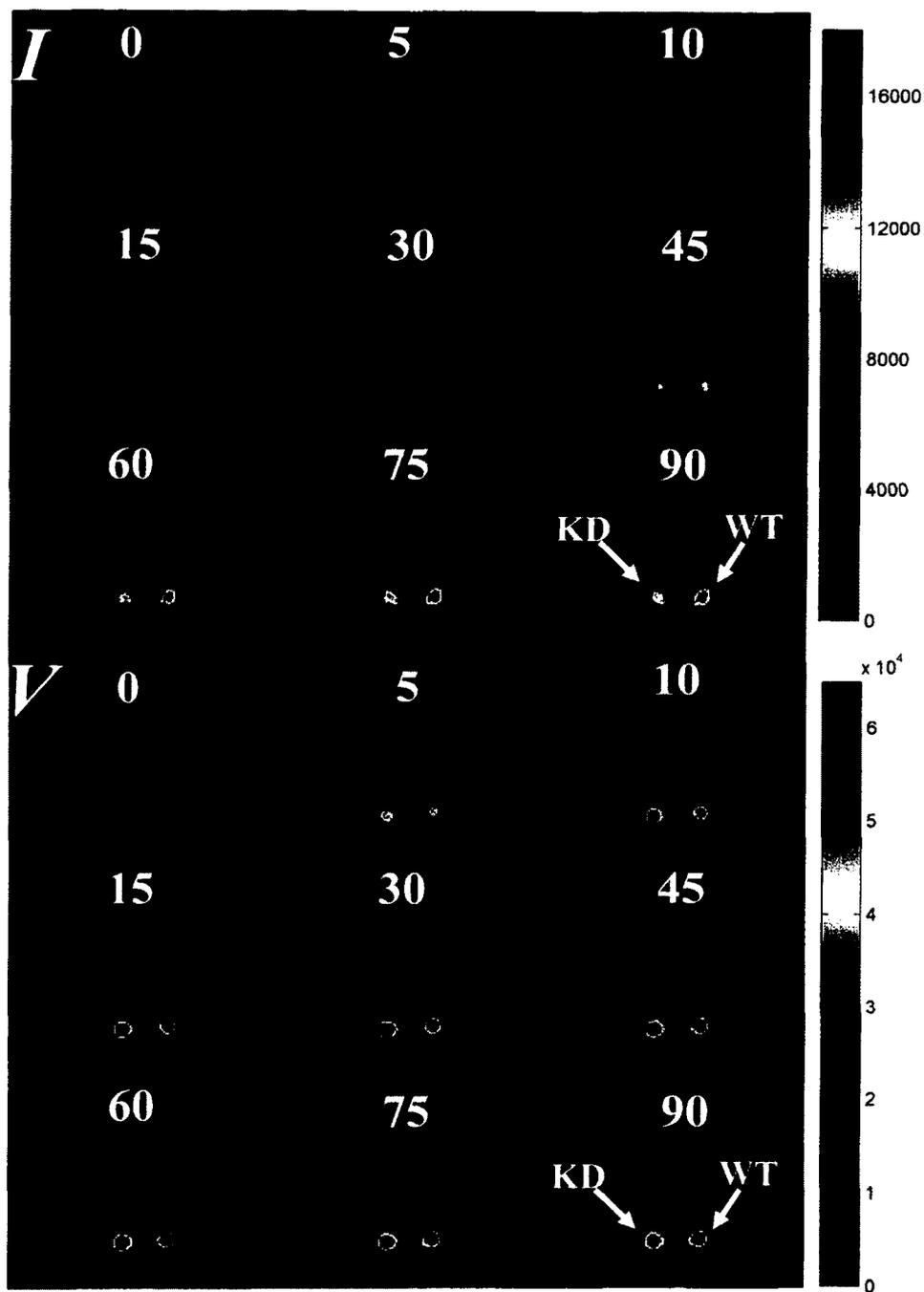


Les expériences contrôle avec les sondes *II*d et *III*d ont permis de confirmer que ces derniers n'étaient pas activés *in vivo*. Ces contrôles négatifs en eux-mêmes ne nous ont pas permis d'évaluer si l'activation des sondes était due à la cible (MMP-2). Toutefois, l'absence de signal notable dans ces contrôles nous permet de dire que la désagrégation de nos sondes *in vivo* n'est pas problématique, car elle ne cause pas l'apparition d'un signal important. Dans le chapitre 4, nous verrons toutefois que *in vitro* (essais de stabilité plasmatique), la désagrégation peut causer une augmentation de signal. Toutefois, il est impossible de discuter de la proportion de signal dû à une désagrégation *in vivo* avec les résultats présentés en Fig. 37.

Un autre problème découvert au cours de l'évaluation des sondes était que le signal des sondes diminuait en fonction du temps (Fig. 38). Les sondes étaient pourtant conservées à 4°C dans le DMSO et à l'obscurité. Les paramètres n'étaient pas modifiés entre les acquisitions. Ceci étant dit, tant qu'une concentration identique de sonde était injectée dans chaque animal (ce qui était le cas), les résultats demeurent valides – l'intensité absolue des images n'étant pas conservée au-delà de la première normalisation lors de l'analyse.



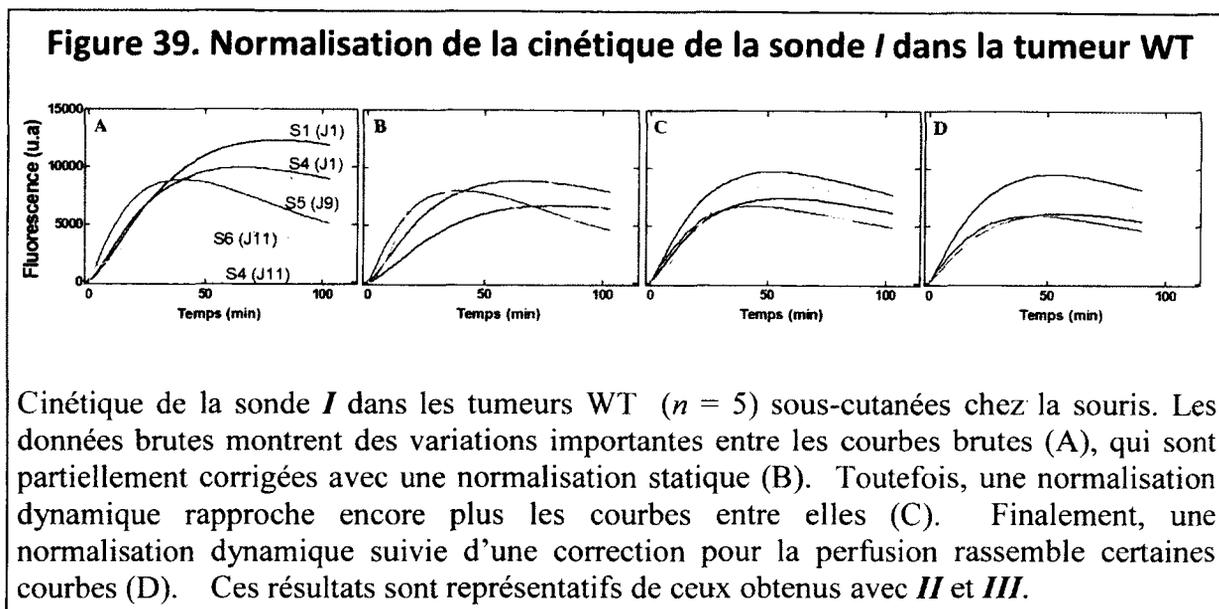
La cinétique de la sonde *I* est présentée à la Fig. 39A. Lorsque ces données brutes sont considérées, la sonde *I* se comporte tel que prévu : son signal augmente davantage dans la tumeur MC7-L1 WT que dans la tumeur MC7-L1 MMP-2 KD (légèrement). Par contre, nous avons aussi effectué un contrôle de perfusion avec la sonde *V* (Fig. 39B). Nous obtenons des résultats similaires à *I*, indiquant que la tendance observée est partiellement due à une différence de perfusion des tumeurs.

Figure 38. Cinétique de *I* et de *V* *in vivo*

Données brutes de l'imagerie dynamique durant 90 minutes après l'injection de la sonde *I* (haut) (jour 1) ou de *V* (bas, jour 6) dans la souris 1. Ces résultats sont représentatifs des autres essais avec *I* ($n = 5$). L'ensemble des essais est présenté plus loin.

2.4.2 Normalisation et correction des données

Afin de mieux démontrer au lecteur l'implication des normalisations statique et dynamique, nous avons effectué les corrections sur un petit ensemble de courbes individuelles (Fig. 40). En comparant les données brutes (Fig. 40A), normalisées de manière statique (Fig. 40B) ou dynamique (Fig. 40C), nous voyons qu'il est possible de corriger pour plusieurs variations inter animal.



Normaliser revient à supposer que le signal au niveau des tissus de référence est similaire chez tous les animaux. En utilisant un point précis dans le temps, comme pour la normalisation statique (p. ex. 90 minutes), nous corrigeons l'intensité pour les variations de dose effective, mais seulement si le niveau d'activation de la sonde est identique dans tous les animaux à ce point. Si l'activation de la sonde au niveau des tissus de référence diffère, nous induisons alors un biais équivalent à cette différence. Il s'agit tout de même d'une approximation de premier ordre de la dose effective qui nous permet de mieux comparer les données obtenues avec différents animaux et entre des séances d'imagerie différentes.

Après la normalisation statique (Fig. 40B), nous avons constaté qu'une variation inter animal importante de l'activation/pharmacocinétique de la sonde survenait. L'une des questions à laquelle nous devons répondre était : cette variation est-elle reliée à la tumeur, ou est-ce un phénomène généralisé au niveau de l'animal. En d'autres termes, pouvions-nous corriger ces variations en utilisant les tissus de référence? Tel que discuté ci-haut, une

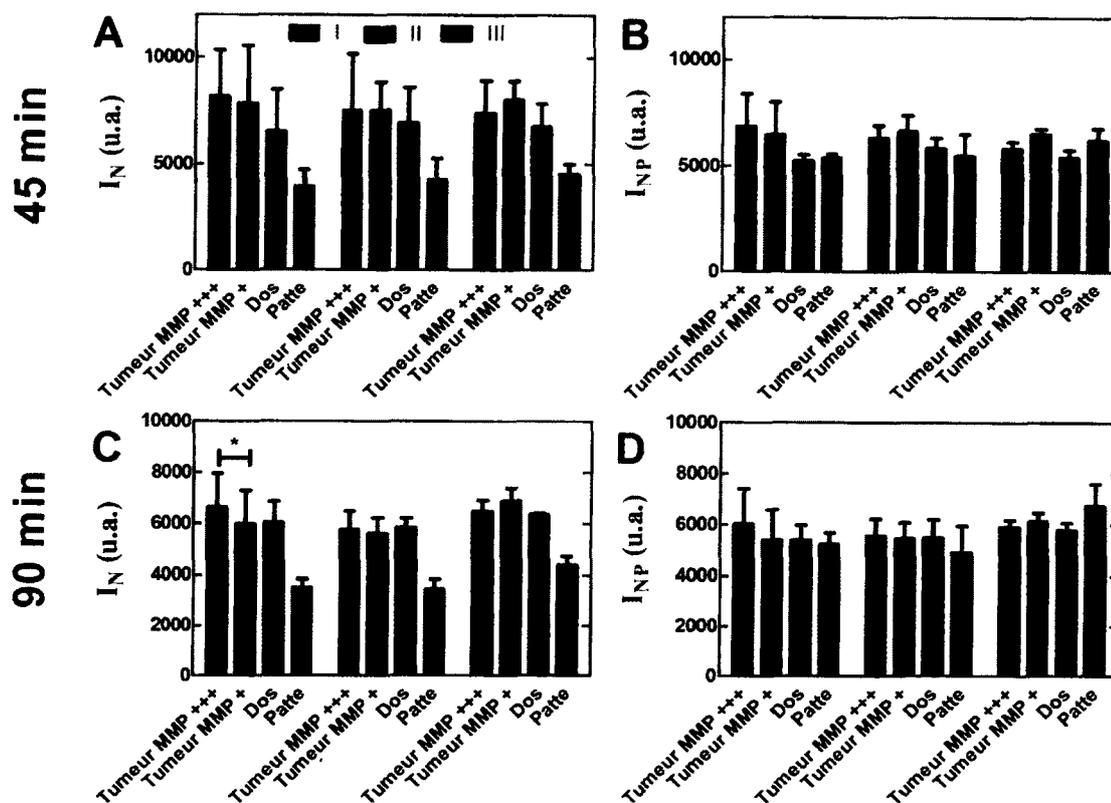
correction statique pose l'hypothèse que dans tous les animaux, la sonde est activée de manière égale dans le tissu de référence. Mais si ce n'est pas le cas, alors nous pouvons aussi corriger pour les différences d'activation non spécifique et de pharmacocinétique. Pour ce faire, nous avons effectué une normalisation dynamique qui élimine les variations de pharmacocinétique entre les animaux – tant au niveau de la distribution, de l'élimination et de l'activation. Attention – ceci ne signifie pas que nous corrigeons pour l'activation de la sonde dans les tissus d'intérêt, mais nous corrigeons pour les différences d'activation inter animal au niveau des tissus de référence.

La correction dynamique avec les tissus de référence nous a permis de générer des courbes très similaires entre elles (Fig. 40C). Ceci nous a indiqué que nous avons été à même de compenser pour une portion de la pharmacocinétique – du moins, pour celle créant le plus de disparité entre les données. Il est intéressant de noter que la forme des courbes était aussi plus homogène. Cette observation est une indication indirecte que la sonde activée se retrouvait un peu partout dans l'animal, y compris dans les régions de référence, et qu'une corrélation élevée entre les tissus d'intérêt (TOI) et les régions de référence (RR) était présente. Nous verrons plus loin que l'une des raisons pour ceci est que la peau recouvrant les tumeurs génère la majorité du signal détecté. Le signal présent dans la Fig. 40C est donc une convolution des différences (a) d'activation et de (b) captation/rétention entre les TOI et les tissus de référence. Il n'est pas possible de différencier entre (a) et (b) sans un contrôle approprié de la perfusion. Nous pouvons effectuer ce contrôle avec les données de la sonde V (Fig. 40D). Bien que ceci disperse les courbes davantage, il est important de noter que l'objectif n'était pas d'avoir un résultat homogène, mais bien un résultat qui n'était pas affecté par des artefacts.

2.4.3 Comparaison des analyses classiques et de l'analyse avec normalisation pour la dose effective et la captation

Afin de mettre en évidence l'importance de la normalisation dans l'interprétation des données, nous avons comparé les données en utilisant une approche « classique », c'est-à-dire en comparant ne regardant que les différences de signal entre les tissus mais sans correction pour la perfusion (Fig. 41).

Figure 40. « Analyse classique » de l'intensité des sondes *I*, *II* et *III* dans les tumeurs 45 et 90 minutes post-injection, et correction de perfusion



Intensités normalisées (I_N) (A, C) et normalisée puis corrigée pour la perfusion ($I_{N,P}$) (B, D), 45 ou 90 minutes post-injection des sondes *I*, *II* et *III* ($n=5$). Les intensités des tumeurs WT (MMP +++) et KD (MMP +) ont été comparées pour chaque sonde avec un test *t* païré bilatéral. * $p < 0.05$. La seule différence significative ($p=0.025$) entre les tumeurs se trouve au niveau des I_N pour *I*. La significativité est perdue lorsque l'intensité est corrigée pour la perfusion ($p = 0.20$).

Nous avons remarqué qu'une différence significative existait entre l'intensité des tumeurs WT et KD avec la sonde *I* après 90 minutes, ce qui n'était pas le cas avec *II* ou *III*. Ainsi, de prime abord, il semblerait que *I* fonctionnait. Il est aussi possible de remarquer que le signal des tumeurs était beaucoup plus élevé que celui de la patte dans tous les cas (Fig. 41A et C). Si nous nous étions limités à cette analyse, comme pour 95% des articles de la littérature, nous aurions pu simplement publier un article qui démontre le bon fonctionnement d'une sonde. L'utilisation d'un contrôle d'activation en acides aminés D

résultait en un signal plus faible, et donc l'activation de la sonde était nécessaire à l'observation d'un signal. La plupart des auteurs s'arrêtent alors à ces preuves incomplètes :

- A) Sonde contrôle en acides aminés D ou utilisation d'un inhibiteur : preuve que l'activation est nécessaire pour le signal
- B) La différence évidente entre le TOI et la RR est l'expression de la MMP-2. Toute différence de signal entre ces derniers « prouve » que la MMP-2 est responsable de l'activation de la sonde.

Nous élaborerons sur ces contrôles plus loin. Pour le moment, afin de démontrer que I_N ne pouvait pas être utilisée telle quelle, nous avons effectué une correction avec le signal de V dans les mêmes animaux. En plus de corriger pour la captation, ce contrôle permettait aussi de compenser partiellement pour les variations géométriques – c'est-à-dire que la patte était plus basse, et parfois à angle par rapport au plan d'acquisition. L'impact de cette correction était visible principalement au niveau du dos et de la patte (Fig. 41B et D) dont le signal rejoint celui des tumeurs. La différence entre les tumeurs avec la sonde I n'était plus significative.

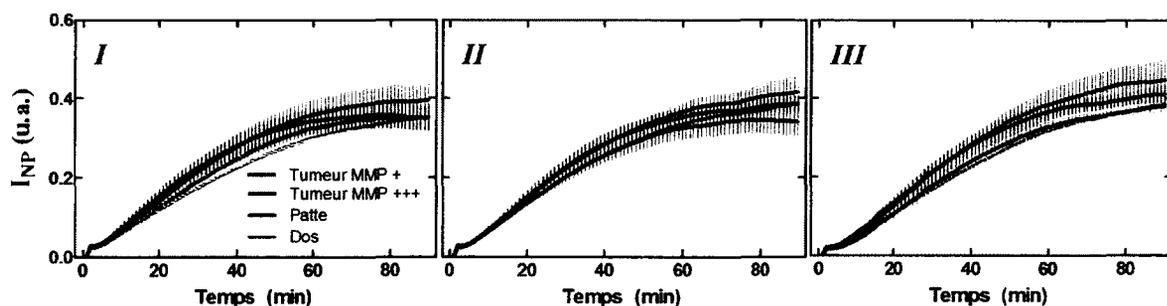
Ceci nous a principalement indiqué que le contrôle de captation était essentiel, mais aussi que ce dernier devait être adapté. Dans notre cas, nous avons utilisé V dont la pharmacocinétique était forcément différente des sondes testées. Un contrôle interne (sonde bi-fluorescente Cy5 (activable) - Cy7 (référence) par exemple) aurait été préférable – mais aurait eu ses propres lacunes, dont la principale est la différence de propriétés optiques.

En conclusion, les cinétiques normalisées et corrigées (Fig. 42) nous ont indiqué qu'il n'y avait pas de différence notable entre les tissus de référence et les tumeurs – quoique les sondes soit activées *in vivo*. La localisation de cette activation demeure toutefois inconnue et il en sera discuté dans le chapitre 6 (Fig. 48).

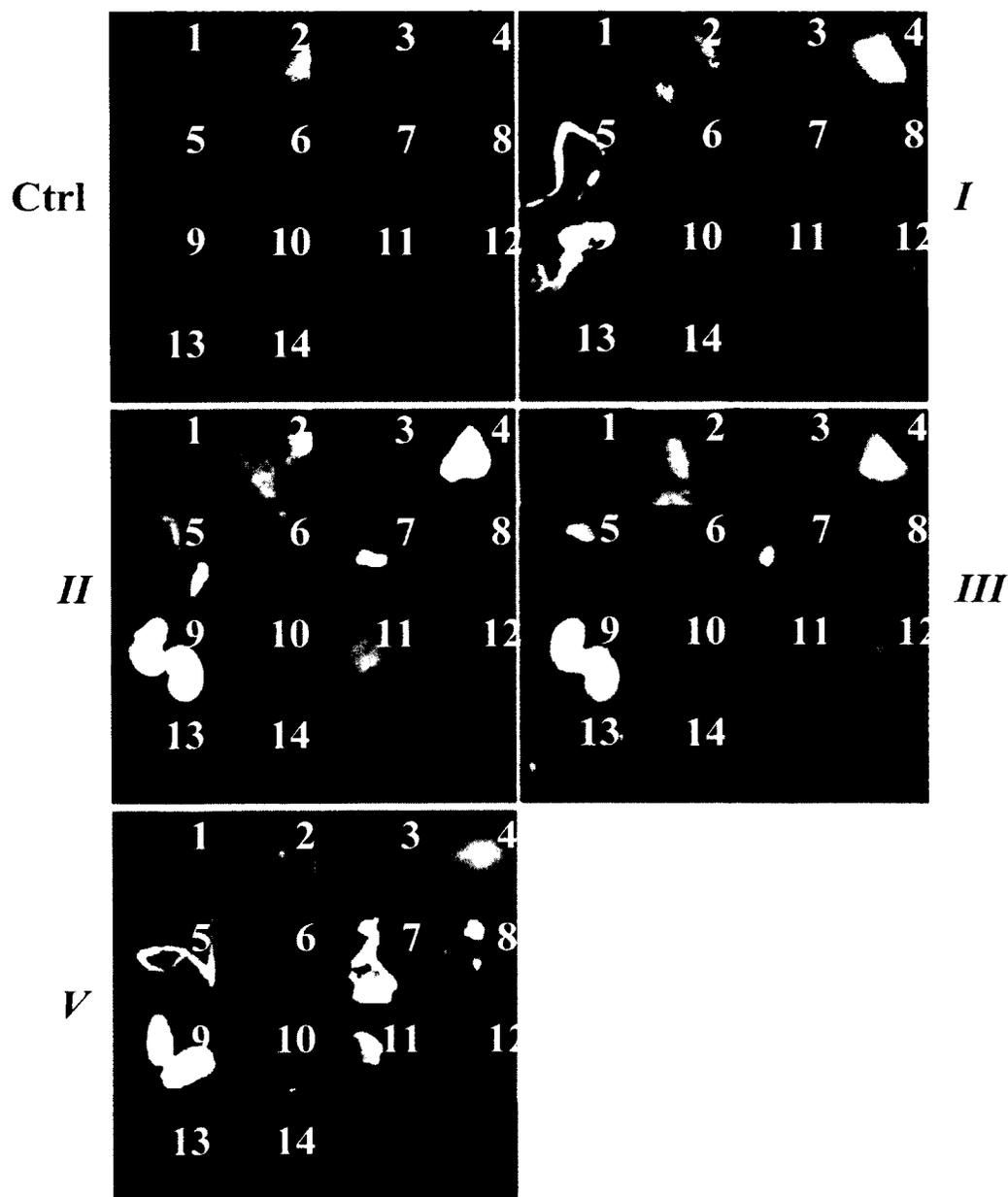
2.4.4 Dissection des animaux post imagerie

Afin de mieux comprendre nos résultats, nous avons procédé à une dissection des animaux après injection des différentes sondes. La biodistribution a permis de confirmer que les sondes *I*, *II* et *III* étaient éliminées par les voies rénales et hépatiques (Fig. 43), et bien que nos données ne nous aient pas permis d'évaluer la voie préférentielle, les reins se remplissaient rapidement après l'injection. La sonde contrôle *V* était éliminée par les mêmes voies. Il est à noter qu'il y avait une hétérogénéité importante dans la biodistribution : les variations d'intensités entre les tissus et les images ne permettaient pas d'identifier clairement la nature du signal (accumulation *vs* activation). Toutefois, dans tous les cas, l'intensité observée avec la sonde *V* était beaucoup plus élevée, tel qu'attendue pour une sonde contrôle positive.

Figure 41. Intensité normalisée et corrigée pour la perfusion des sondes *I*, *II* et *III* dans les tumeurs WT (+++), KD (+) et les tissus de référence.



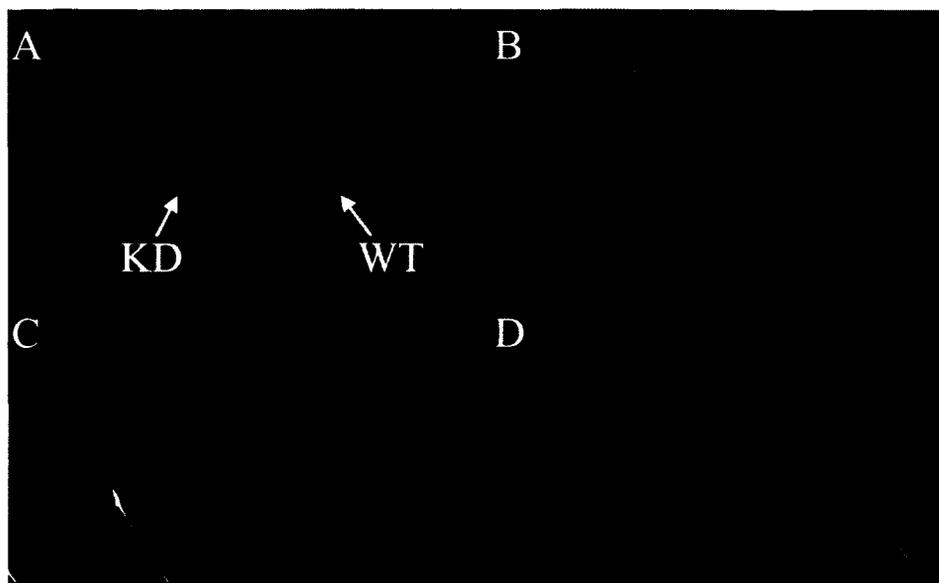
L'intensité normalisée et corrigée pour la perfusion (I_{NP}) donne un résultat similaire pour toutes les sondes et les tissus – et une comparaison avec un test-t pairé bilatéral ne permet pas de démontrer une différence significative entre les tumeurs. Dans le cas du produit *I*, la courbe de la tumeur MMP +++ (WT) se démarque de la tumeur MMP + (KD) avec une tendance à la limite de la significativité.

Figure 42. Biodistribution post-injection de *I*, *II*, *III* et *V*

Les biodistributions ont été effectuées 2h post injection. Les organes sont (dans l'ordre, de gauche à droite, et de haut en bas) (1) le sang, (2) les poumons, (3) le cœur, (4) le foie (un unique lobe – toujours le même), (5) l'intestin, (6) l'utérus (et les ovaires lorsque possible), (7) la vessie, (8) un muscle (patte droite, mollet), (9) les reins, (10) le cerveau, la tumeur MMP-2 KD ((11) vue de dessus avec peau, (12) vue de dessous), la tumeur WT ((13) vue de dessus avec peau, (14) vue de dessous). Les images avec *V* ont été acquises avec une caméra différente de celle utilisée pour les autres biodistributions (modification du système d'acquisition) et l'intensité ajustée afin de ramener le signal des cerveaux à des intensités similaires.

Peu de différence entre les tumeurs a été détectée dans les biodistributions. Toutefois, après les injections, nous avons porté attention au site tumoral. Nous avons comparé le signal avec et sans la peau afin d'évaluer si le signal observé en surface reflétait correctement le signal disponible au niveau de la tumeur (Fig. 44).

Figure 43. Vérification de la pénétration du signal



Retrait de la peau et soulèvement des tumeurs, avec prise d'image en champ clair (A et C) puis en fluorescence (B et D) 2h post injection de *I*. Les tumeurs MC7-L1 WT sont envahissantes et ont tendance à s'incruster dans le tissu adipeux sous la peau. Les tumeurs MC7-L1 MMP-2 KD forment des masses rondes et facilement retirables. Le signal de la tumeur WT (droite) est visible malgré la présence de la peau, mais est grandement atténué (flèche grise).

Une faible pénétration du signal pourrait être responsable de la faible différence de signal entre les tissus de référence et les tumeurs (Fig. 41 B et D – valeurs de signal similaire entre le dos et les tumeurs). La peau des souris contenant une concentration appréciable des sondes génère une proportion importante du signal – et ce signal était similaire pour les deux tumeurs. Le signal des tumeurs peut être complètement différent (disons, 50% de différence), mais au *pro rata* du signal total, à cause de l'absorption du signal des tumeurs en profondeur (par la peau), la différence observée en surface n'était alors que de quelques pourcents.

Nous avons remarqué que le signal ne provenait pas autant de la tumeur que des tissus avoisinants (Fig. 45). Il est probable que la vascularisation réduite des centres des tumeurs ne permettait pas une pénétration adéquate de la sonde et son activation dans les tumeurs en tant que tel. La tumeur pouvait toutefois produire de la MMP-2 qui diffusait dans les tissus avoisinants, et que ces tissus produisaient eux-mêmes de la MMP-2 suivant l'invasion de la tumeur. De par la faible production de MMP-2 des tumeurs KD et leur caractère peu envahissant, nous sommes à même de nous attendre à ce que les tissus avoisinants les tumeurs KD contiennent moins de MMP-2 et soient moins accessibles. Nous avons observé une différence de signal appréciable entre les tumeurs KD et WT avec les sondes *I*, *II* et *III* (Fig. 46). Toutefois, la normalisation de ces images avec l'intensité des images en champ clair mitigeait énormément ce signal – ce qui laisse supposer que la nature intrinsèque des tissus serait responsable de cette différence. Une comparaison avec des animaux ayant reçu la sonde *V* n'a pas permis de mettre en évidence de différence entre les sondes *I*, *II*, *III* et la sonde contrôle (Fig. 47). Une confirmation de ce résultat sera nécessaire, car la différence entre les tumeurs KD et WT n'a pas été détectée dans le cadre de ces dernières expériences.

En résumé, les sondes développées sont activées *in vivo*, mais cette activation n'est pas nécessairement spécifique aux tumeurs.

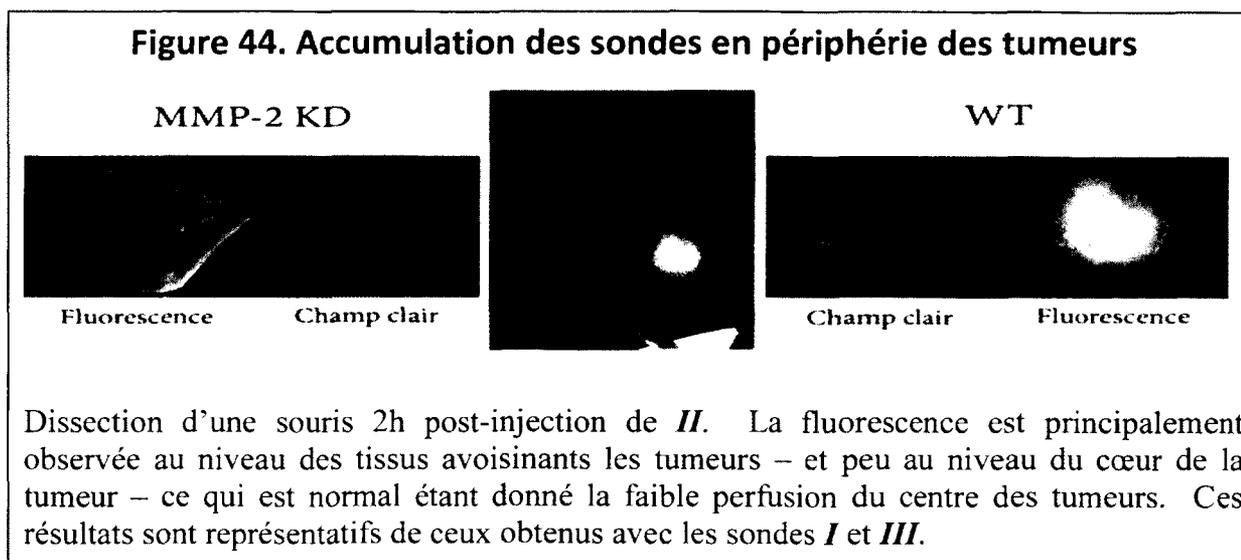
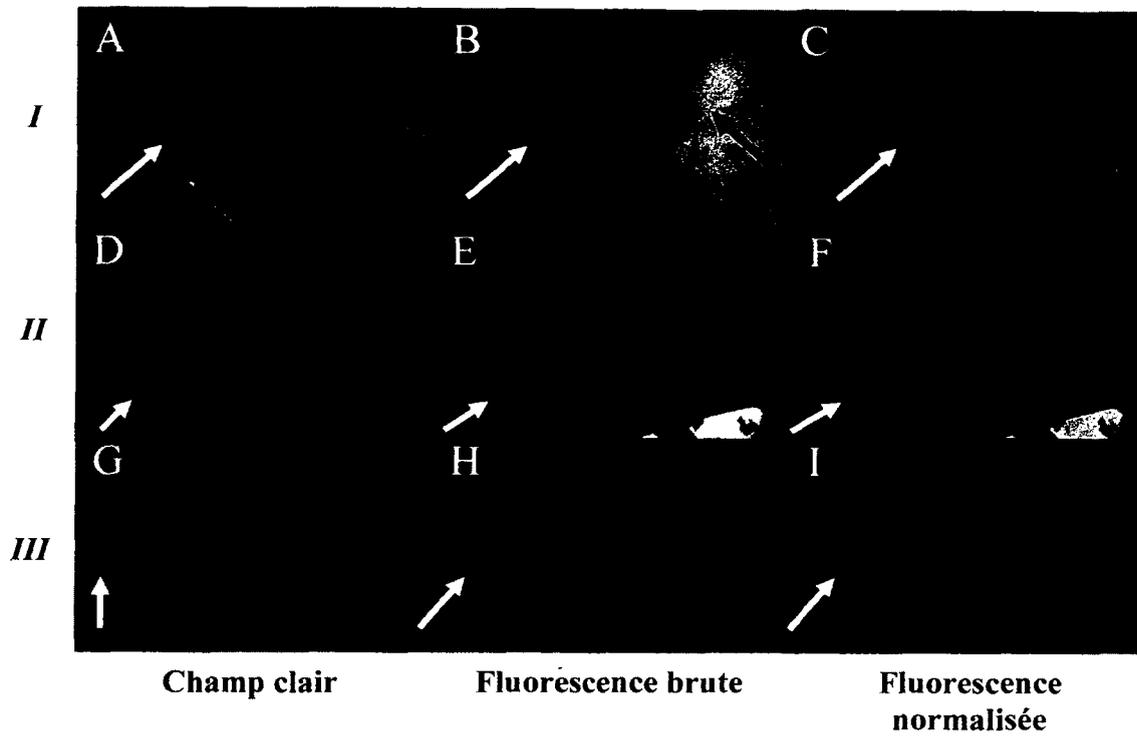


Figure 45. Dissection : Fluorescence des tumeurs et normalisation avec les images en champ clair



Comparaison des tumeurs WT (flèches rouges) et MMP-2 KD (flèches blanches) 2 h post-injection des sondes *I* (A, B, C), *II* (D, E, F) et *III* (G, H, I). Les images en champ clair (A, D, G) ont été utilisées pour normaliser (division) les images de fluorescence (B, E, H), et les images résultantes (C, F, I) ne permettent pas de clairement différencier les tumeurs. Notez que dans les images de fluorescence, il y a une inégalité de droite à gauche dans les images (surtout visible en B).

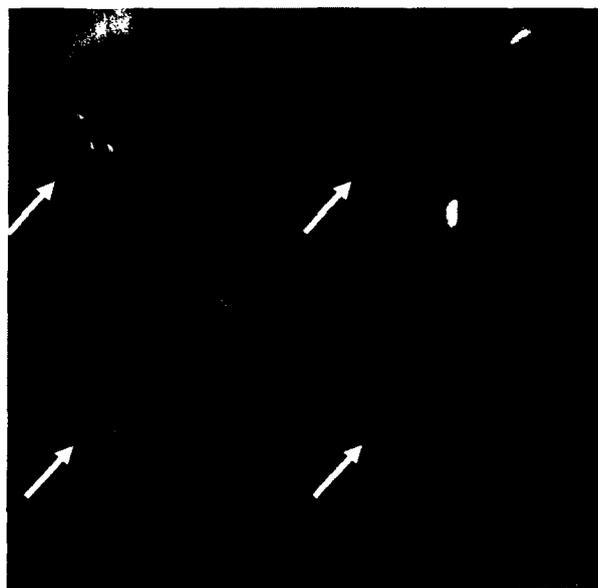


Figure 46. Dissection : Comparaison des tumeurs post-injection de *I* et de *V*

Cette comparaison d'animaux 2 h post injection de *I* (A, B) ou de *V* (C, D) démontre que ces sondes résultent en des patrons de distribution similaires, entre autre au niveau de la peau et des tissus autour des tumeurs. Dans les deux cas, il n'y a aucune ou peu de différence entre les tumeurs WT (f. rouges) et MMP-2 KD (f. blanches). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec les sondes *II* et *III*.

2.5 Variation de la captation dans un modèle de radiothérapie

En parallèle avec notre travail portant sur la préparation de sondes fluorescentes spécifiques à la MMP-2, nous avons défriché l'utilisation du nouvel appareil d'imagerie optique (Quidd Optical Scanner - QOS). Plus particulièrement, en collaboration avec Quidd Inc., nous avons testé une sonde fluorescente devant nous permettre de déterminer le volume tumoral en fonction du temps. Cette sonde, QEPR-1.8, est non spécifique – c'est-à-dire qu'elle ne cible aucune molécule en particulier (elle ne cible pas la MMP-2). Plutôt, elle est transportée par le flux sanguin et s'accumule dans les tissus simplement grâce à son poids moléculaire élevé et par effet EPR. L'objectif de ce travail était simplement de suivre le volume tumoral par fluorescence en tant que potentiel substitue pour l'IRM ou la prise de mesure manuelles à l'aide d'un Calliper. Ces expériences ont été effectuées avec un modèle murin portant deux tumeurs MC7-L1 WT sous-cutanées, irradiées ou non avec une unique dose de rayons gamma. L'irradiation ralentit la croissance de la tumeur. Notre hypothèse de travail était que, grâce à la fluorescence, il serait possible de suivre cette diminution de croissance, puisque la sonde s'y accumulera en quantité moindre (moins d'espace disponible). Le lecteur est dirigé vers le Chapitre 5 pour les résultats.

Il est important de noter que notre expérience avec l'imagerie de fluorescence étant limitée (premières expériences *in vivo* avec l'imageur optique), nous ne nous attendions pas à un effet aussi drastique de l'irradiation sur la captation de notre sonde. Plutôt que de voir une réduction du signal de fluorescence due à la diminution de volume tumoral, la captation de QEPR-1.8 a été grandement augmentée par l'inflammation causée par l'irradiation des tissus avoisinants. Ceci met en évidence à quel point l'inflammation présente dans un modèle de pathologie peut mener à des artéfacts de captation – surtout si un traitement est apporté, ou lorsque comparée à une région de référence où il n'y a pas d'inflammation. Il est à noter que l'athérosclérose, l'arthrite et l'infarctus sont des pathologies impliquant une réponse immunitaire et une inflammation. Ainsi, le Chapitre 5 amène un lourd argument sur l'importance des contrôles de distribution non spécifique (portion de la distribution qui est liée aux propriétés intrinsèques (poids moléculaire, charge, volume hydrodynamique, etc.) d'une sonde, surtout lors de l'évaluation de nouvelles sondes dans un modèle de pathologie (incluant ou non un traitement).

Chapitre 3. A novel solubility-switchable MRI agent allows the non-invasive detection of matrix metalloproteinase-2 activity *in vivo* in a mouse model

En se basant sur les molécules développées par Lepage et al (2007), notre équipe a développé et caractérisé un nouvel agent de contraste ciblant la MMP-2. Les détails de la synthèse et de la caractérisation ont été discutés et publiés dans deux autres manuscrits (Jastrzebska et al., 2009; Jastrzebska et al., 2009).

A novel solubility-switchable MRI agent allows the non-invasive detection of matrix metalloproteinase-2 activity *in vivo* in a mouse model

Auteurs de l'article: Réjean Lebel, Beata Jastrzębska, Hélène Therriault, Marie-Michèle Cournoyer, J. Oliver McIntyre, Emanuel Escher, Witold Neugebauer, Benoit Paquette, Martin Lepage

Statut de l'article : Publié dans *Magn Reson Med* 2008; **60**(5): 1056–1065.

Avant-propos :

La contribution de l'auteur de cette thèse comprend l'ensemble des essais *in vivo* de la sonde et de ses contrôles, l'analyse des données d'imagerie, la préparation des figures et 95% de la rédaction du manuscrit, ainsi que sa correction. Le travail effectué par d'autres collaborateurs consiste principalement en la caractérisation biochimique des tumeurs (Fig. 2) et en la synthèse des molécules testées (Fig. 1).

Résumé:

Un nouvel agent de contraste a été développé pour détecter l'activité de la MMP-2, une enzyme possédant un rôle pro-invasif dans le cancer. L'agent inclut un commutateur de solubilité, dont le clivage réduit la solubilité du groupement comprenant l'entité contrastante. Nos résultats dans un modèle murin du cancer du sein (MC7-L1) nous indiquent que ceci mène à une accumulation de l'agent dans une tumeur produisant un haut niveau de MMP-2 (tumeur WT) comparativement à une tumeur dont la production de MMP-2 est réduite (tumeur MMP-2 KD). Lorsqu'une séquence peptidique brouillée et non reconnue par la MMP-2 *in vitro* est insérée dans le commutateur de solubilité, la différence de contraste entre les tumeurs est perdue. En conclusion, notre nouvel agent s'accumule de manière spécifique dans une tumeur contenant un haut niveau de MMP-2 activée.

Article inclus avec permission. R. Lebel *et al.* Magnetic resonance in medicine (2008). 60(5) p.1056. © John Wiley & Sons, Inc.

Introduction

Biochemical characteristics and gene expression during tumor progression have been investigated for several decades in prospect of identifying molecular targets for anti-cancer therapy or molecular markers that would help select optimal therapy. While several such molecules have been discovered over the years, these are often specific to a restricted number of cancer types. Nevertheless, the continuous improvement of characterisation tools for *in vivo* use is critical both to study such molecules or targets in humans, and to eventually use this biochemical information as a prognostic factor in the selection of the most appropriate anti-cancer therapy for a given patient. Currently, the most common prognostic factors are stage, grade and histology, but treatment outcome may vary greatly despite similar tumor characteristics (1). Imaging methods that are in common clinical practice, such as positron emission tomography (PET), magnetic resonance imaging (MRI), and ultrasound, provide functional, vascular and anatomical data that can be used to assess tumor stage but more detailed information on tumor progression would be an asset to both clinicians and scientists designing new treatments and monitoring treatment response.

Information establishing tumor stage is often biochemical in nature, such as the increased secretion of a chemical messenger, a modified protein expression or proteolytic activity. Some of these subtle clues may indicate the stage of progression of tumors. For example, the human matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of 24 zinc-dependent proteases that have been shown to play a role in the extracellular matrix (ECM) degradation and remodeling in several normal and pathological processes, including embryogenesis, wound healing, arthritis and cancer (2). The ECM is mostly composed of type IV collagen, which is cleaved by MMP-2 and MMP-9 (known as the gelatinases). One of the turning points in cancer progression is the acquisition of metastatic potential. To invade neighboring tissues and organs, solid cancer cells must modify their anchoring and motility properties and degrade the basal membrane in order to gain access to the lymphatic or circulatory systems (3). Hence, the expression and activation of either MMP-2 or MMP-9 is often observed in the progression of solid tumors towards malignancy (3) and the expression of MMP-2 has been extensively studied in several cancers [for a review, see Turpeenniemi-Hujanen (4)]. Although MMP-2 expression has been significantly correlated

with the metastatic potential and the invasiveness of cancer cells *in vitro* and *in vivo* (5) and references therein), and although the absence of MMP-2 in a mouse model was linked with decreased angiogenesis (6), its prognostic value is still in question. For example, although breast tumors in patients were screened for MMP-2 activity in a number of studies, a significant correlation between MMP-2 levels (presence or activity) and prognosis could not always be found [(7) and references therein]. Since those studies involved collection during the initial surgery of single samples of tumors that were tested for MMP-2 activity or concentration, possible variations in MMP-2 expression and activity over time could not be evaluated. Determination of MMP-2 activity at different time points is thus desirable.

Although MMPs were proposed as targets for anti-cancer therapy about a decade ago (3), and MMP inhibitors (MMPIs) were brought into clinical investigation, most trials ended in complete failure (8). At least two main issues have been identified in the light of clinical and pre-clinical data. First, MMPIs were tested on advanced-stage cancer patients, but MMPIs had been shown in animal models to have potent effect during early tumor stages and little effect thereafter. The second issue, which will be addressed here, is the need for an assay to measure MMP activity *in vivo* (8). In the absence of these crucial data, it is suspected that doses of inhibitor employed in clinical trials might not have been sufficient to inhibit their target. More recently, as new roles for MMPs have emerged, some individual members of the MMP family have been identified as targets (including MMP-2 and -7), and others as anti-targets for cancer therapy (9). Thus, it is important to evaluate the types of cancer and the relevant tumor stages where specific MMPs are involved, such that the usefulness of specific MMPIs in an anti-cancer treatment could be assessed more decisively (9). Recently, fluorescent probes were developed for optical molecular imaging of MMP-2 (10) and MMP-7 (11) activity *in vivo* in mouse models and are useful and sensitive tools for preclinical research. There may be limited scope for using optical probes in humans since with fluorophores both the excitation and emission photons are strongly absorbed and scattered limiting imaging depth to <1 cm in tissue.

MRI has an exquisite spatial resolution and is able to probe the heterogeneous physiology and functional activity of solid tumors. However, contrast agents (CAs) developed in order to detect specific and endogenous biochemical processes are still

relatively few. The low sensitivity of MRI and the difficulty in modulating the contrast afforded by CAs before and after interaction with a specific target may explain this phenomenon. In 2000, Meade and co-workers pioneered an approach whereby the access of water to a Gd paramagnetic ion responsible for the contrast in T_1 -weighted images was modulated by the activity of β -galactosidase (12). Recently, a new type of CA bearing a solubility-switch was successfully used to detect the activity of MMP-7 (13). In that concept, the CA is cleaved by an enzyme or a proteinase and the cleaved CA becomes strongly hydrophobic, thus acquiring poor elution kinetics from the cleavage site. The cleavable CA had different pharmacokinetic patterns in MMP-7 positive and MMP-7 negative tumors in a mouse model of colorectal cancer, but an uncleavable control CA did not. Similarly, the pharmacokinetic patterns of the cleavable CA were identical in both tumors after treatment of the animal with a broadband MMP inhibitor. Those proof-of-concept studies demonstrated the feasibility of detecting MMP enzymatic activity *in vivo* by MRI. We modified the design of that compound and developed a novel CA cleavable by MMP-2, hereafter referred to as PCA2-switch. In the present study, we have characterized this novel CA *in vitro* and *in vivo* in a mouse model of mammary tumors. To confirm the specificity of our agent, we compared the data obtained in tumors grown from wild-type (WT) MC7-L1 mouse mammary carcinomas overexpressing MMP-2, against tumors grown of the same cells but knocked-down (KD) for MMP-2. After systemic administration of PCA2-switch, we find a significantly higher relative increase in longitudinal relaxation rate in WT tumors compared to KD tumors. As a function of time after injection, this activation is revealed by a second increase in relaxation rate after the initial increase attributed to the perfusion of the agent from the blood into the ECM of all tumors. To our knowledge, this is the first report demonstrating that MMP-2 activity can be detected *in vivo* by MRI.

Materials and methods

Chemicals and biological materials

ProMMP-2 and MMP-2 were acquired from Calbiochem (San Diego, CA, USA). The lentiviral plasmid pLK0.1-puro was acquired from Sigma (Oakville, ON, Canada). The Bio-Rad DC Protein Assay was acquired from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). The Bio-Rad DC (detergent compatible) protein assay was purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada). The Proteases Inhibitor Complete Mini mixture, EDTA-free, was acquired from Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA). All chemicals and solvents for the synthesis were purchased from commercial sources and were used without further purification. Fmoc-protected amino acids were acquired from Chem-Impex International, (Wood Dale, IL, USA). 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-tris-*tert*-butyl acetate-10-acetic acid - DOTA-tris(*t*Bu) ester was purchased from Macrocyclics (Dallas, TX, USA). Fmoc-amido-PEG₈-OH was purchased from Quanta Biodesign (Powell, OH, USA). TentaGel S RAM was purchased from RAPP Polymere (Tübingen, Germany). Gadolinium (III) chloride hexahydrate and p-aminophenylmercuric acetate (APMA) were purchased from Sigma (Oakville, ON, Canada).

Mouse mammary carcinoma cells

The mouse mammary carcinoma cell line MC7-L1 was generously provided by Dr Alfredo A. Molinolo of the Instituto de Biología y Medicina Experimental, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas en Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina (14). The MC7-L1 cells were grown in MEM supplemented with 10% FBS, 1 mM sodium pyruvate, 2 U/ml penicillin G, 2 µg/ml streptomycin and 250 ng/ml amphotericin B.

Downregulation of MMP-2 by RNA interference

The activity of MMP-2 in MC7-L1 mammary carcinoma cells was downregulated such that we could test our CAs in tumors expressing different levels of MMP-2. A stable MMP-2 downregulated MC7-L1 clone was prepared by the RNA interference (RNAi) (15). The

down-regulation and the presence of residual MMP-2 in MC7-L1-KD cells were confirmed by zymography, with proMMP-2 or MMP-2 as molecular weight controls.

Quantitation of MMP-2 by zymography

Five million MC7-L1-WT cells, MC7-L1-KD cells or MC7-L1 cells transfected with non-silencing shRNA were plated in 6-well plates and incubated in Minimum Essential Medium (MEM) 10% Fetal Bovine Serum (FBS) overnight. Culture media were then removed and the cells washed twice with Phosphate Buffer Saline (PBS). MEM FBS-free was added and cells were incubated for 24 h. Conditioned media were collected and the protein content was determined using the Bio-Rad DC Protein Assay (19). Aliquots of 2 ng were applied on a 12% polyacrylamide- sodium dodecyl sulfate (SDS) gel containing 0.2% gelatine, a substrate for MMP-2, and electrophoresed at 150 V during 3 h at 4°C. After removal of SDS from the gel by incubating in 2.5% Triton X-100 (30 min, room temperature), the gel was incubated at 37°C for 18 h in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 5 mM CaCl₂, 1 μM ZnCl₂, 1% Triton, and stained with Coomassie blue R-250 (17, 18). As a control, proMMP-2 was activated with 1 mM 4-aminophenylmercuric acetate (APMA) as previously performed (17, 18) and was applied to the zymography gel. Activated MMP-2 was also applied on the zymography gel to serve as a standard.

MMP-2 activity was also determined in MC7-L1-WT and MC7-L1-KD tumors implanted in the hind limbs of Balb/c mice. Briefly, MMP-2 was extracted from six-week old tumors in a buffer containing a protease inhibitor mixture. The protein concentration of tumor extracts was determined using the Bio-Rad DC (detergent compatible) protein assay (19). Ten μg of protein extracts were applied on a zymography gel and analyzed as previously described.

Mouse model of mammary tumors

Animal experimentations were approved by the Ethics Committee on Animal Research of the Université de Sherbrooke. Balb/c mice were injected subcutaneously with 1×10^7 MC7-L1-KD in the left hind limb, followed one week later by 2×10^6 MC7-L1-WT cells in the right hind limb. All cells were in 0.1 ml phosphate buffer solution. The timing and the

larger number of MC7-L1-KD cells were chosen to compensate for the more rapid growth of WT cells. Four weeks later, the average volume of the WT tumors ($n = 8$) was $315 \pm 125 \text{ mm}^3$ and that of the KD tumors ($n = 8$) was $324 \pm 150 \text{ mm}^3$. The difference was not significant.

Synthesis of peptide-based CAs

The procedure for the synthesis, purification and identification of the CAs will be reported elsewhere, only the salient features are presented here. Our solubility-switch CA, hereafter referred to as PCA2-switch, is centred on a peptide substrate that can be cleaved by MMP-2 (SGESPAY*YTA, where "*" indicates the cleavage site) described by Chen *et al* (20). As a control, a scrambled peptide sequence (SYPATAYA) was also synthesized (Fig. 1b), and is, hereafter referred to as PCA2-scrambled. Gd-DOTA was linked to the peptide chain *via* a 12-carbon alkyl chain, making this entity less hydrophilic. The aqueous solubility of the compound was increased by covalently linking a 8-unit polyethylene glycol (PEG₈) chain at the carboxy-terminus of the peptide (Fig. 1a). Upon cleavage of PCA2-switch by MMP-2, the PEG chain will be detached from the CA and the hydrophobic fragment bearing the Gd chelate is expected to acquire slower pharmacokinetics, i.e., slower wash-out from tissue after proteolytic cleavage.

Kinetics of cleavage by MMP-2

A free amino group is formed upon enzymatic cleavage of a peptide, and this can be monitored by adding fluorescamine. This enzymatic assay was adapted to a 96-well plate (21), and the cleavage efficacy $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ was determined according to a published protocol (22). The value of $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ of the Ac-SGESPAYYTA-NH₂ peptide ($1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) with MMP-2 was similar to that reported by Chen *et al* ($4.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (20). This small difference can be explained by the form of MMP-2 used. The enzymatic assays of Chen *et al* were performed with the catalytic fragment of MMP-2 produced in their laboratory, while the whole active form of MMP-2 was used for our assays. We tested the isolated peptide (SPAYYTAA) of PCA2-switch and found a cleavage efficacy of $3.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. We determined whether this peptide was still efficiently cleaved when coupled to the alkyl and PEG chains. The cleavage efficacy of PCA2-switch was $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}} = 1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

While PCA2-switch was cleaved efficiently and yielded only a single pair of fragments (as identified by HPLC and mass spectrometry), the cleavage efficacy of the scrambled version PCA2-scrambled containing the peptide SYPATAYA was 37.5 times lower ($k_{\text{cat}}/K_m = 3.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) and four primary fragments indicating a non-specific cleavage were observed by HPLC and identified by mass spectrometry. Detailed *in vitro* characterization of the reagent and its scrambled version will be published separately.

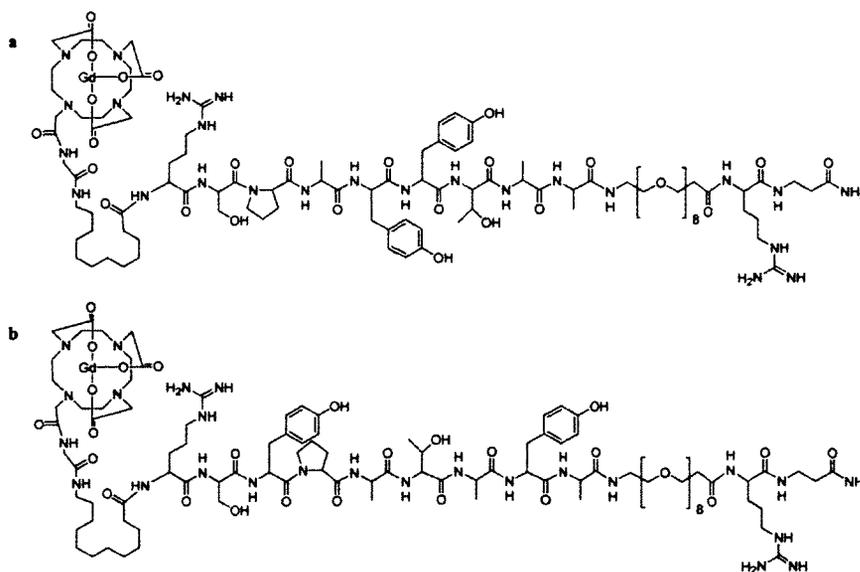


Figure 1. Structure of the contrast agent **a**: PCA2-switch and **b**: PCA2-scrambled. The peptide sequence of PCA2-switch is efficiently cleavable by MMP-2 but that of PCA2-scrambled is cleaved 37.5 times less efficiently by MMP-2. Both agents also include a Gd-DOTA complex, a hydrophobic alkyl chain, and a hydrophilic PEG chain. Note the location of the alkyl chain is in-line with the peptide (one end of the alkyl chain is linked to the peptide and the other end is linked to Gd-DOTA). This is different compared to our previously published MMP-7 agent where the alkyl chain was branching out from the end of the peptide (13).

Statistical analysis

Statistical analysis of the difference of ΔR_1 variations between WT and KD tumors with PCA2-switch was confirmed with an unequal-variance T-test. Variance difference between the mean ΔR_1 for each time point of each curve was tested with an F-test to confirm the

selection of our T-test. Slopes of ΔR_1 progression in KD tumors with PCA2-switch and PCA2-scrambled were compared using the StatstiXL package in Microsoft Excel 2003.

Magnetic resonance imaging

MRI studies were conducted at the *Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke* with a 210 mm small animal 7T scanner (Varian Inc. Palo Alto, CA, USA) and a 40 mm volume RF coil. Dynamic contrast-enhanced (DCE) MRI studies included the acquisition of a pre-contrast T_1 ($T_{1,0} = 1/R_{1,0}$) map using a multiple flip angle approach ($\alpha = 10, 20, 25, 35, 50^\circ$), and a gradient echo sequence with TR: 100 ms, TE: 2.49 ms, matrix: 128×128 , FOV: $30 \times 30 \text{ mm}^2$, NA: 4, 10 slices 1.5 mm thick. Sets of T_1 -weighted images using the same sequence and $\alpha = 30^\circ$ were acquired continuously before, during and after injection of CA with a temporal resolution of $\sim 51 \text{ s}$.

Injection of CA in the caudal vein was performed remotely *via* a catheter inserted at least two days prior to the imaging session. Mice either received Magnevist ($n = 7$), PCA2-switch ($n = 8$) or PCA2-scrambled ($n = 4$). The quantity of CA injected was $2 \text{ } \mu\text{mol}$ for PCA2-switch and PCA2-scrambled and $8.5 \text{ } \mu\text{mol}$ for Gd-DPTA (Magnevist, Berlex). During imaging, animals were anesthetized with 3% (initiation) and 1.5% (stabilization) isoflurane in air. A feedback-controlled animal warm-air heater system was used to keep the animal body temperature at physiologic levels and the respiration rate was continuously monitored (SA Instruments Inc., Stony Brook, NY, USA).

The signal intensities were converted to relaxation rate values using the following equation (23):

$$R_1(t) = (1/TR) \cdot \ln \left\{ \left[S_0 \cdot \sin \alpha \cdot \exp(-TE/T_2^*) - S(t) \cdot \cos \alpha \right] / \left[S_0 \cdot \sin \alpha \cdot \exp(-TE/T_2^*) - S(t) \right] \right\}, \quad (1)$$

where S_0 is the fully relaxed magnetization for a given voxel and is computed via:

$$S_0 = S_- [1 - \exp(-TR/T_1) \cos \alpha] / \{ [1 - \exp(-TR/T_1)] \sin \alpha \cdot \exp(-TE/T_2^*) \}, \quad (2)$$

where S_- is the steady-state intensity before CA injection. It is assumed that $TE \ll T_2^*$. Then, the time-dependent value of R_1 is set equal to:

$$R_1(t) = R_{1,0} + r_1(t) \cdot C(t) = R_{1,0} + \Delta R_1(t), \quad (3)$$

where R_1 , the relaxation rate, is related to the measured initial relaxation rate, $R_{1,0} = 1/T_{1,0}$ and the relaxation rate variation (ΔR_1). The variation is proportional to both the concentration C and the relaxivity r_1 of the CA. The CAs are designed to become hydrophobic after cleavage by MMP-2 making agglomeration and/or interaction with proteins and cell membranes possible. These phenomena are all likely to change the values of r_1 before and after cleavage, hence the time dependence of this parameter in Eq. 3.

Selection of ROIs, analysis and normalization

ROIs were traced over the whole tumors, carefully avoiding regions where partial volume artifacts were observed on T_1 -weighted or T_2 -weighted images. The signal intensity of each voxel was converted into a ΔR_1 value using eq. 1, this was done at all time points. The mean ΔR_1 values were normalized to the highest mean ΔR_1 value within 6 minutes of the beginning of the injection. Each ROI was normalized independently (except in the case of the tests with Gd-DTPA, see below), and the resulting curves from every animal were averaged and are presented (Figs. 6 and 7). In the case of Gd-DTPA (Fig. 3), the ΔR_1 values of both ROIs (tumors) were normalized against the WT tumor highest mean ΔR_1 value within 6 minutes of the beginning of the injection. This allows comparing the perfusion between WT and KD tumors. The error bars in Figs. 3, 6 and 7 are the standard error on the mean of all time courses with a particular agent and in a particular tumor. At each time point, the mean ΔR_1 of coupled time courses (same agent, different tumor type) were submitted to a paired T-test to evaluate if the difference was significant ($p < 0.05$). Time points that yielded a statistical difference were indicated with an asterisk.

In order to facilitate the comparison of the various time courses, the ΔR_1 variation was fitted with a linear function at time frames corresponding to 10 to 30 and 44 to 68 minutes after the initial ΔR_1 increase. These time frames were selected based on the

features observed in the experiments with PCA2-switch in the WT tumor as discussed in the results section.

In vitro MRI characterization of the CAs

The relaxivity r_1 of each CA was determined in H₂O and in a solution of bovine serum albumin (BSA, 14 mg/ml). Ten 500 μ l samples of CAs with a concentration varying between 0.5 mg/ml (200 μ M) and 0.001 mg/ml (0.4 μ M) were poured in plastic syringe cap sealed with ParafilmTM. The samples were warmed and kept to \sim 30°C with a flow of warm air. Inversion recovery preparation times of 0.01, 0.02, 0.07, 0.1, 0.2, 0.7, 1, and 1.5 s were used before a spin echo sequence (TR: 4,500 ms, TE: 30 ms, matrix size: 256 \times 256, field of view: 60 \times 60 mm², 1 slice with a thickness of 2 mm).

Results

Validation of the MC7-L1 tumor model

Expression of the MMP-2 gene in MC7-L1 mouse mammary carcinoma cells was down regulated by RNA interference with two shARN, which resulted in an almost complete inhibition of the MMP-2 protein production. This includes both MMP-2 (66 kDa) and its inactive precursor, proMMP-2 (72 kDa). MMP-2/proMMP-2 levels were assessed by zymography, and were found to be greatly reduced in the MC7-L1-KD cells compared to the MC7-L1-WT cells (Fig. 2a). Note that proMMP-2 is chemically activated during the process.

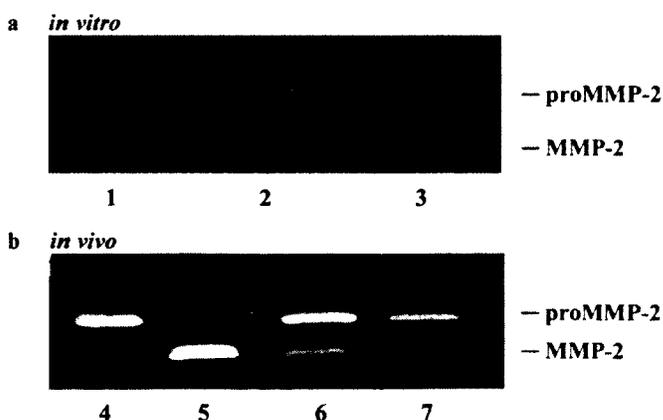


Figure 2. MMP-2 and proMMP2 expression assessed by zymography. **a:** From *in vitro* cultured MC7-L1 cells 1) proMMP-2 (control, Calbiochem), 2) MC7-L1-WT cells, 3) MC7-L1-KD cells. **b:** From MC7-L1 tumors grown in Balb/c mice. 4) proMMP-2 (control, Calbiochem), 5) MMP-2 (control, Calbiochem), 6) MC7-L1-WT tumor, 7) MC7-L1-KD tumor. This gel is representative of the results obtained in a total of 4 gels. Overall, MMP-2 enzyme and its precursor levels are greatly reduced in KD cells.

The animal model consisted of Balb/c mice inoculated subcutaneously with MC7-L1-KD and MC7-L1-WT cells in the right and left hind limbs, respectively. We verified by zymography that the MMP-2 activity was roughly 51% lower in tumors grown from MC7-L1-KD cells as compared with MC7-L1-WT cells (Fig. 2b).

Study of tumoral characteristics with Gd-DTPA

We evaluated the physiologic characteristics of WT and KD tumors using Gd-DTPA. The initial increase of R_1 (0 – 5 min after injection) is attributed to the distribution of Gd-DTPA in each tumor, which can be dependent upon the blood volume and upon the perfusion of each tumor. In order to highlight possible pharmacokinetic differences, such as those expected for PCA2-switch, the ΔR_1 values were normalized to the quantity of CA in the WT tumor shortly after injection as shown in Fig. 3.

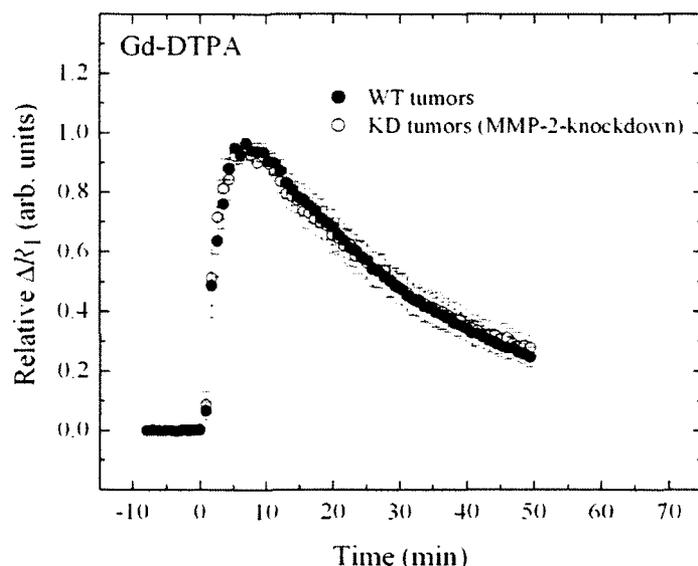


Figure 3. Comparison between WT and KD tumors ($n = 7$) with Gd-DTPA injected intravenously. Very similar changes of relative ΔR_1 indicate the microvascular permeability is similar in both tumor types.

The resulting *relative* ΔR_1 values were identical for the two tumors when using Gd-DTPA. This analysis does not preserve the information on the absolute R_1 changes, but this is relatively unimportant since by design the pharmacokinetic properties of PCA2-switch are predicted to be affected by cleavage, while its initial distribution should only depend on the microvascular properties of the tumors and the injected dose. This normalization permits direct comparison of the pharmacokinetics of the CAs by accounting for both tumor-to-

tumor and animal-to-animal variability. Error bars presented in Fig. 3 (and in Figs. 6 and 7) indicate the standard error of the mean.

Characterisation of the CAs

We verified whether the relaxivity of PCA2-switch and of the cleaved PCA2-switch were the same since the size and the interaction of the CAs will be different. Both factors may affect the rotational correlation time of the molecule, which in turn may affect the longitudinal relaxivity (r_1). We expect the molecule to have a lower rotational correlation time after cleavage, because of the reduction of its MW, which should translate into a decrease of its r_1 . On the other hand, the increase of hydrophobicity caused by the loss of the PEG group may lead to agglomeration and/or interactions with macromolecules (lipids, protein, etc.). This second effect would increase the rotational correlation time and increase r_1 . The relaxivity of the parent CA (PCA2-switch) in H₂O was found to be 2.06 (\pm 0.04) mM⁻¹s⁻¹, and that of the cleaved PCA2-switch was 2.18 (\pm 0.03) mM⁻¹s⁻¹. Under the same conditions, the relaxivity of Gd-DTPA was 3.58 (\pm 0.10) mM⁻¹s⁻¹. In the BSA solution, the relaxivity of the parent PCA2-switch was 2.03 (\pm 0.03) mM⁻¹s⁻¹ and that of the cleaved PCA2-switch was 2.19 (\pm 0.02) mM⁻¹s⁻¹. A small difference of 7% was found to be statistically significant (repeated measures ANOVA).

MRI detection of MMP-2 activity in vivo

The ability of PCA2-switch to detect MMP-2 activity was tested in an animal model with two tumors, one grown from MC7-L1-WT cells overexpressing MMP-2 compared to normal tissues, and the other tumor grown from MC7-L1-KD cells. Figure 4 shows a T_1 -weighted image of both tumors after injection of PCA2-switch, and the corresponding pre-injection T_2 -weighted axial image for one slice of a representative animal. The signal in the bladder of animals in T_1 -weighted images was readily enhanced immediately after injection of any of the CAs, suggesting rapid elimination by the kidneys. ROIs were drawn on the WT tumor (left, red overlay) and the KD tumor (right, green overlay) of each animal, carefully avoiding regions where partial volume artifacts were observed on T_1 -weighted or

T_2 -weighted images. Also shown in Figure 4 are the relative ΔR_1 maps for each tumor at four different time points (0, 16, 42 and 76 min) after injection of PCA2-switch. For both tumors, the relative ΔR_1 increases and subsequently decreases indicating eventual wash-out of the contrast agent.

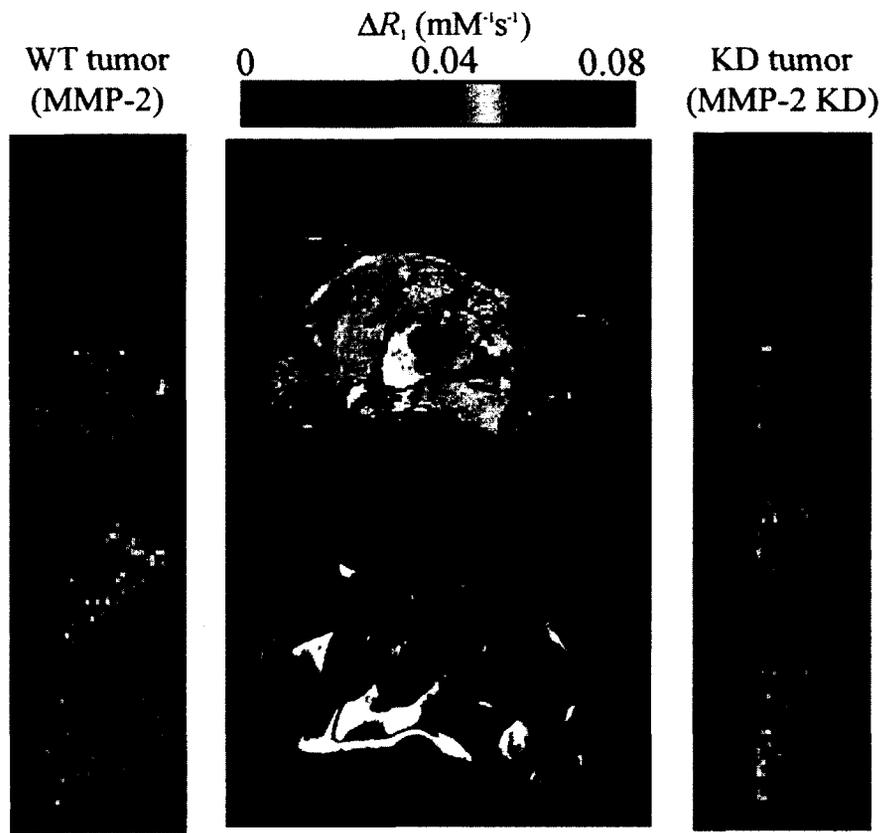


Figure 4. T_1 -weighted (middle top) after injection of PCA2-switch and the corresponding pre-injection T_2 -weighted (middle bottom) axial image for one slice of one animal. Regions of interests were drawn on the WT tumor (left, red overlay) and the KD tumor (right, green overlay) of each animal, carefully avoiding regions where partial volume artifacts were observed on either T_1 -weighted and T_2 -weighted images. The left and right columns are composed of relative ΔR_1 maps for the WT and the KD tumors, respectively at four different time points (0, 16, 42 and 76 min). For both tumors, the relative ΔR_1 increases and is eventually washed out.

Results obtained from a single animal are displayed in Figure 5. A rapid absolute ΔR_1 increase is observed following injection of PCA2-switch or Gd-DTPA for both WT

and KD tumors. When PCA2-switch is used, the initial increase in the KD tumor is followed by a slight decrease and a nearly constant level thereafter. The pharmacokinetics of PCA2-switch in the WT tumor is markedly different. The initial increase is similar to that observed in the KD tumor. However, following a nearly constant level up from 5 to 20 min after injection, a second increase with a maximum near 40 min is clearly observed and reaches a ΔR_1 value two-fold higher than in the KD tumor.

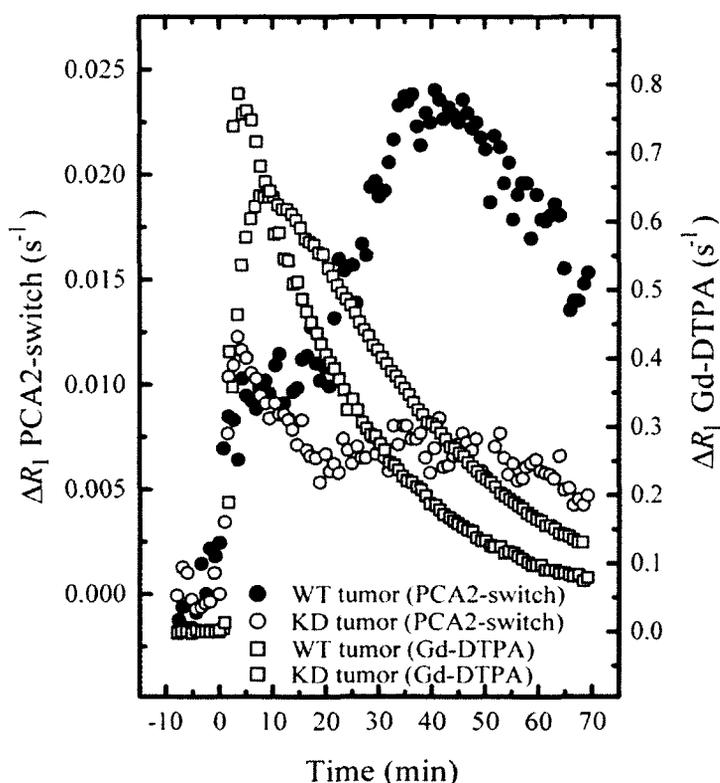


Figure 5. Absolute change of R_1 (ΔR_1) from a mouse model injected with PCA2-switch (left axis) and with Gd-DTPA (right axis) two days before. ΔR_1 still increases in the WT tumor 20 min after injection of PCA2-switch, ΔR_1 remains nearly constant in the KD tumor. The washout kinetics of Gd-DTPA is comparable in both tumors with perhaps a slower uptake and clearance of the MMP-2 KD tumor in this animal.

Gd-DTPA had been injected to the same mouse the day before as a control for tumor perfusion and vessel permeability (Fig. 5). In that case, the variations of ΔR_1 are comparable for both WT and KD tumors. A rapid increase is followed by a continuous decrease. The ΔR_1 increase for Gd-DTPA in the KD tumor may be slightly slower than in the WT-tumor for this particular animal, a difference that is the opposite to the trend observed with PCA2-switch reagent in the same mouse. It is noteworthy that the washout kinetics for PCA2-switch was much slower than for Gd-DTPA. The changes in ΔR_1 in both tumors are small when using PCA2-switch compared to those observed when using

Gd-DPTA. This is immediately apparent when comparing the scales on the left (PCA2-switch) and right (Gd-DTPA) axes of Figure 5. Thus, a relatively small quantity of PCA2-switch was sufficient to demonstrate a difference between WT and KD tumors.

Tumor-to-tumor and animal-to-animal variations were addressed by calculating relative relaxation rate increases (relative ΔR_1) for each animal and each tumor. The ΔR_1 values were normalized to the initial ΔR_1 increase observed in individual tumors to account for differences in blood volume, as observed using Gd-DTPA (Fig. 3). The results for one animal show this initial increase are almost equal for the WT and KD tumors after injection of PCA2-switch (Fig. 5), but the increase is around 25% larger for the WT tumor after injection of Gd-DTPA. The reverse trend was observed in other animals, such that overall the magnitude of the enhancement is similar for both tumors. The dose of Gd-DTPA (8.5 μmol) was larger than that of PCA2-switch (2.0 μmol), which accounts for part of the 50- to 60-fold larger increase of R_1 with Gd-DTPA. Presumably, most of the difference in R_1 -response with the two reagents arises from higher tissue permeability of Gd-DTPA, i.e., the same dose of Gd-DTPA and of PCA2-switch should result in a higher tumor concentration for Gd-DTPA because leakage of a CA through the vasculature decreases as a function of the molecular size.

Figure 6 shows the variation of the relative ΔR_1 as a function of time averaged over eight animals injected with PCA2-switch. The averaged results are qualitatively similar to those of the individual animal in Fig. 5. An increase in relative ΔR_1 is clearly observed in both tumors shortly after injection of the CA. Following the initial increase, drastically different pharmacokinetics are observed for the two tumors. First, a short plateau is reached in curve of the MMP-2-positive WT tumor, followed by a marked increase up to 40 min. The relative ΔR_1 values are statistically different (T-test, $p < 0.05$) at time frames denoted by the asterisk in Figure Fig. 6. Second, the KD tumor displays a slow washout, which is slower than what is observed after injection of Gd-DTPA (see Fig. 3).

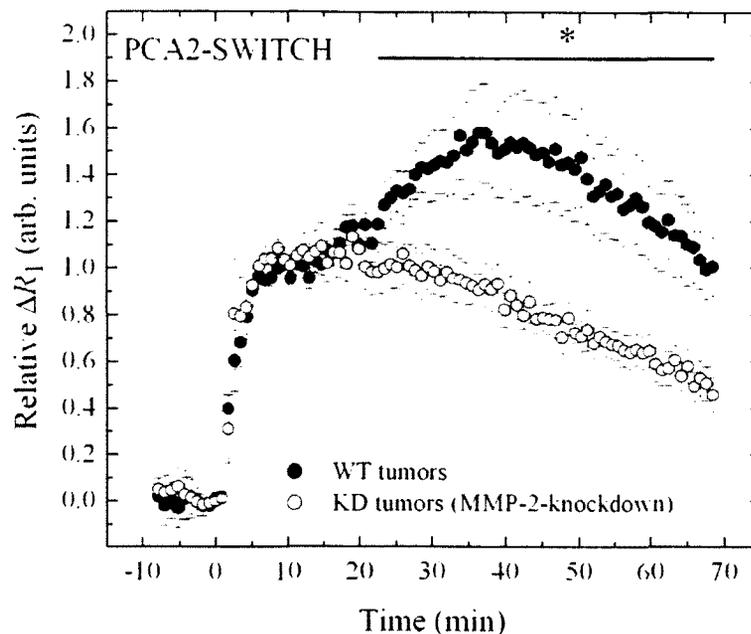


Figure 6. Comparison between WT and KD tumors ($n = 8$) with PCA2-switch injected intravenously. The relative change in relaxation rate (ΔR_1) normalized to the initial increase enables a direct comparison between animals and between tumors. Both tumors are perfused by PCA2-switch, but while ΔR_1 decreases after 10 min in the KD tumor, a significant ΔR_1 increase is observed in the WT tumor. The kinetics differ significantly (T-Test, $p < 0.05$) under the line marked with an asterisk.

Specificity of the MMP-2 detection

We synthesized a control CA that incorporated a scrambled sequence of the MMP-2 cleavable peptide that is resistant to cleavage by MMP-2 (i.e., PCA2-scrambled). The pharmacokinetics of PCA2-scrambled is comparable in WT and KD tumors (Fig. 7). This is in sharp contrast to the different pharmacokinetics observed for PCA2-switch in these tumors (Fig. 6). These data suggest that the pharmacokinetics of PCA2-switch is specifically related to the cleavage of the MMP-2 substrate. In fact, the trend observed in Fig. 7 is that PCA2-scrambled is washed out slightly more slowly from the KD tumor than from the WT tumor, a kinetic difference that is opposite to results obtained with PCA2-switch (Fig. 6). There is no difference between PCA2-switch in the KD tumors and PCA2-scrambled in both tumors, except for the last ~ 10 points (T-test, $p < 0.05$). On the other

hand, the pharmacokinetics of PCA2-switch in WT tumors was found to be different from that of PCA2-scrambled in both tumors (T-test, $p < 0.05$).

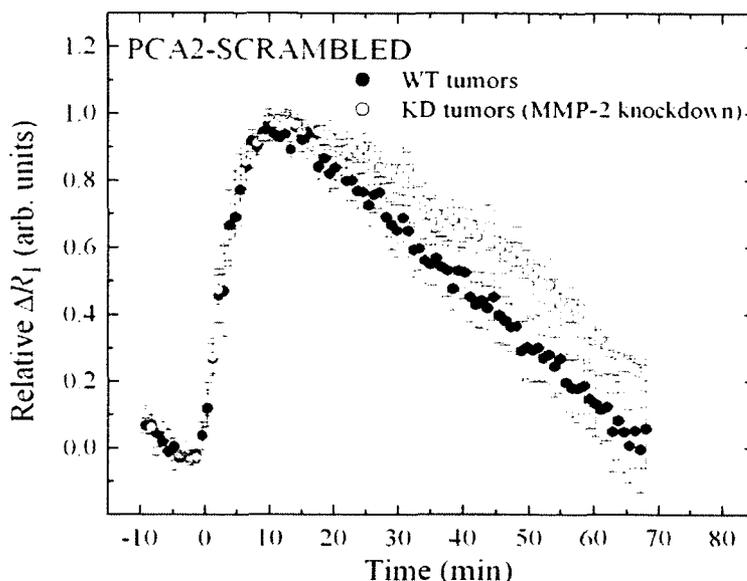


Figure 7. Comparison between WT and KD tumors ($n = 4$) with PCA2-scrambled injected intravenously. Similar changes of relative ΔR_1 confirm that the different pharmacokinetics observed for PCA2-switch is dependent upon the peptide sequence incorporated into the contrast agent. No significant difference was found between the time courses (T-Test, $p < 0.05$).

The curves in Figs. 3, 6 and 7 were fitted with a linear function in the intervals from 10 to 30 min and from 44 to 68 min after injection, and the slopes tabulated (Table 1). In the first interval, a steep increase of relative ΔR_1 is observed in the WT tumor after injection of PCA2-switch, while a decrease is measured with PCA2-scrambled. In the KD tumor, there is no difference between the agents during this interval. From 44 to 68 minutes after injection, the decrease is slower for PCA2-switch in the KD tumor compared to that of PCA2-scrambled, while the slope is similar in the WT tumor with the two CAs.

Table 1: Variation of relative ΔR_1 (min^{-1}) after the initial bolus for two different contrast agents (PCA2-switch and PCA2-scrambled) in two different tumors (MMP-2 knockdown, KD) and wild-type (WT).

Tumor - Agent	Slope 10 to 30 minutes (10^{-2} a.u.* min^{-1})	Slope 44 to 68 minutes (10^{-2} a.u.* min^{-1})
WT - PCA2-switch	2.00 (± 0.19)	-2.06 (± 0.09)
KD - PCA2-switch	-0.69 (± 0.10)	-1.23 (± 0.07)
WT - PCA2-scrambled	-1.50 (± 0.10)	-1.78 (± 0.07)
KD - PCA2-scrambled	-0.81 (± 0.08)	-1.88 (± 0.06)
WT - Gd-DTPA	-1.83 (± 0.04)	NA
KD - Gd-DTPA	-2.04 (± 0.04)	NA

Discussion

MMP-2 activity is usually assessed *in vitro* by zymography (24), and MMP-2 or TIMP-2 concentration by immunohistochemistry (4). These kinds of assay indicate a correlation of either the presence of MMP-2 activity, or MMP-2/TIMP-2 ratio, with tumor malignancy and invasiveness. For clinical evaluation, both methods require the collection of a biologic sample from patients, an invasive procedure that usually occurs before or during anti-cancer treatment. Furthermore, such biopsies cannot probe the tumor heterogeneity that is typical of many cancers or the variation over time of either MMP activity or other enzymes that contribute to cancer progression. In the present study, we have developed a novel CA for the non-invasive detection of MMP-2 activity *in vivo* by MRI.

Characterisation of the tumor mouse model

The MMP-2 production of MC7-L1-WT cells line was reduced using a genetic modification to produce MC7-L1-KD cells. The production of proMMP-2 in MC7-L1-KD cells is not reduced to zero, as it would have been the case with MMP-2 null transgenic animals. However in Fig. 2a, zymography results show that there is a marked reduction in MMP-2 in the KD *versus* WT cells. The expected reduction in MMP-2 activity is observed in tumor tissues extracted from subcutaneous tumors grown from KD *versus* WT cells in Balb/c mice. On the other hand, MMP-2 expression is not limited to the tumor cells as

some stromal components, e.g., fibroblasts, endothelial cells and inflammatory cells, in addition to various cell types in the blood can also produce MMP-2 (25). These sources of MMP-2 may result in a “background” cleavage of PCA2-switch. The stromal contribution is included in the zymography from the tumors and the results indicate the overall level of MMP-2 expression in KD tumors is 51% lower than in WT tumors.

The reduced MMP-2 activity in KD tumors may lead to reduced angiogenesis, which could explain the slower growth rate of the KD tumors compared to WT tumors. The quantity of KD cells inoculated to animals was five times that of WT cells, and they were inoculated one week earlier than WT cells such that their size was comparable at imaging. The vascular permeability in these two tumors is comparable as judged from the relative curves in Fig. 3 obtained after injection of Gd-DTPA. Histology measurements could be used to assess microvessel density but the relative permeability of these neovessels would still remain a matter of debate. Overall, the Gd-DTPA studies reveal a similarity in the perfusion and washout kinetics of both KD and WT tumors.

Detection of MMP-2 activity using PCA2-switch

The ability of our CA to detect MMP-2 activity was tested on an animal model. A first ΔR_1 increase shortly after injection of PCA2-switch is seen in both tumors (Fig. 6). The same increase is seen after the injection of PCA2-scrambled (Fig. 7) and is attributed to the initial perfusion of the CA within the tumors. This is followed by a continuous decrease in both tumors for PCA2-scrambled (Fig. 7). Different pharmacokinetics are observed after injection of PCA2-switch. As with PCA2-scrambled, PCA2-switch in the KD tumor shows a maximum at ~5 min post-injection, followed by a continuous decrease. By contrast, PCA2-switch in the WT tumor overexpressing MMP-2 exhibits a second increase in ΔR_1 leading to a maximum at around 40 min post-administration of the reagent (Fig. 6). The second increase is attributed to the cleavage of PCA2-switch by MMP-2, resulting in an accumulation of the hydrophobic cleaved PCA2-switch in the WT tumor. It is probable that not all of PCA2-switch is being cleaved. As a result, a ΔR_1 decrease due to the

excretion of intact PCA2-switch is expected to be superimposed over the increased ΔR_1 resulting from the accumulation of the cleaved PCA2-switch.

The MMP-2 activity in KD tumor is not zero, such that some cleavage of PCA2-switch and the consequent accumulation of the hydrophobic cleaved CA can be expected. This may explain the difference in the slopes of the decreasing ΔR_1 in the KD tumor when comparing PCA2-switch *versus* PCA2-scrambled, i.e., in the interval from 44 to 68 min after injection, ΔR_1 decreases faster [$-1.88 (\pm 0.06) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$] for the uncleavable PCA2-scrambled compared to PCA2-switch [$-1.23 (\pm 0.09) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$].

When using the control PCA2-scrambled, which is not expected to be selectively cleaved, a similar single increase followed by a continuous decrease was observed for both the WT and KD tumors. Again, we attribute the increase to the initial distribution of the CA within the tumor. The slope of the continuous decrease in the PCA2-scrambled curve is smaller than that observed when injecting Gd-DTPA, indicating Gd-DTPA is washed out faster from the tumor. This is attributed to the larger molecular weight of PCA2-switch (2,444 Da) compared to that of Gd-DTPA (938 Da) and to the presence of a PEG chain, which is known to increase the plasma half-life of compounds (26).

We assume that the level of MMP-2 activity is the limiting factor during the cleavage reaction. This means that there is a likely trade-off between the amount of agent present in a tissue (contrast), and the possibility of detecting MMP-2 activity. For example, a concentration of CA that would over-saturate the MMP-2 activity would “flood” the tumor with intact CA, such that the ΔR_1 increase related to the accumulation of the hydrophobic product would be buried in the large and unspecific ΔR_1 increase from the intact CA. Conversely, a minimal CA concentration is required for ΔR_1 to be nonzero. Further studies to verify this dose-response trade-off are warranted. Our work was performed in a tumor model with two different levels of MMP-2 activity (WT (1) and KD (2) tumors), and a zero-signal instance (PCA2-scrambled). Because of this, the extent of our discussion remains semi-quantitative. To achieve absolute quantification, it will be necessary to acquire a large amount of data using tumors with various levels of MMP-2

activity, to perform an external calibration of this activity (i.e. by using gel zymography) in individual tumors and to better characterize MMP-2 activity *in vivo*.

In our recent studies, a solubility-switchable CA for MRI was used to detect MMP-7 activity in a mouse model of xenograft human colorectal cancer (13, 27). In that study, the hydrophobic character of the CA was provided by a 7-carbon side chain. We determined the hydrophobic character conferred by an alkyl side-chain was larger than for the in-line strategy used for PCA2-switch (Fig. 1a) for the same number of carbon atoms (results not shown). The larger hydrophobic character of both the intact and the cleaved forms of the MMP-7 CA resulted in markedly slower pharmacokinetics; the accumulation of CA in MMP-7-positive tumors could be observed for over 160 min, as compared to ~40 min in our current report. We determined that a faster kinetics than that of the MMP-7 agent would have a larger potential for translation to the clinic. To achieve this, we modified the design of the agent to reduce its hydrophobic character by placing the alkyl chain in line with the peptide, rather than as a side-chain. The results obtained with Gd-DTPA in the colorectal xenograft tumors (13, 27) were however qualitatively similar to those of Fig. 3, suggesting that differences in microvessel density or permeability in the two tumor models are not significant. Note that the molecular weights of MMP-7 and of MMP-2 CAs are each ~2,400 Da, such that the difference in pharmacokinetics cannot be explained by this property of the CAs.

The methodology used in the current work is more quantitative than in our previous studies (13, 27). Here, the signal intensities are converted to relaxation rate values *via* a pre-contrast T_1 map, such that CA concentration can be evaluated if the *in vivo* relaxivity of the CA is known. Normalization of the signal intensity into ΔR_1 units relative to the initial perfusion has the advantage of enabling comparisons between the excretion kinetics of the agent in both tumors without issues related the initial entry of the agent. The relaxivity of the parent [$2.06 (\pm 0.04) \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$] and the cleaved [$2.18 (\pm 0.03) \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$] were determined *in vitro* in water and do not differ sufficiently to account for the large difference in ΔR_1 (repeated measures ANOVA, $p < 0.05$). Two competing effects may be at play to explain the constant relaxivity of the CA. First, a decrease in relaxivity could have been measured after cleavage since the rotational correlation time of the smaller CA is likely to be shorter.

On the other hand, agglomeration of the cleaved hydrophobic CA could have resulted in a longer rotational correlation time, which would have resulted in a larger relaxivity. The results indicate that these two effects are cancelling each other, or that the two effects are not detectable in our experimental conditions. We tested whether these values were likely to differ *in vivo* in the presence of proteins and other macromolecules (28). Relaxivity measurements were repeated in a solution of BSA and the results were identical, suggesting that the *in vitro* and *in vivo* relaxivities may be comparable. The *in vitro* relaxivity data support the contention that the increase of ΔR_1 observed *in vivo* derives from increased PCA2-switch accumulation resulting from increased hydrophobicity and decreased solubility after proteolytic cleavage, and not by a change in relaxivity.

Conclusions

We have developed a novel CA for MRI, named PCA2-switch, which is centered on a peptide sequence cleavable by MMP-2. *In vivo*, this resulted in a statistically significant increase of the relative ΔR_1 as a function of time in a tumor expressing MMP-2. The water-solubility of PCA2-switch was decreased upon cleavage by MMP-2, which detaches a hydrophilic PEG chain from the CA. This increase of ΔR_1 was not observed in tumors grown from the same cells but with a knockdown of the MMP-2 expression. Similarly, injection of a control CA that incorporated a peptide sequence resistant to MMP-2 (PCA2-scrambled) resulted in similar ΔR_1 curves for both tumors. Finally, injection of Gd-DTPA showed the perfusion of both tumors was comparable. The solubility-switch concept appears effective in detecting the activity of MMPs *in vivo* in a mouse model, but further work is required to determine the sensitivity and the quantitative response of these novel solubility-switchable contrast agents.

Acknowledgments

We would like to thank Dr François Boudreault, Université de Sherbrooke, for having generously provided the lentiviral vector and the 293T cells. EE, WN, BP and ML are members of the FRSQ-funded Centre de recherche clinique Étienne-Le Bel. ML is the Canada Research Chair in magnetic resonance imaging. We thank Mélanie Archambault for her help in setting up the animals for imaging, Véronique Dumulon-Perreault, Céléna Dubuc and Simon Authier for assistance in inoculating the tumor cells in animals, as well as Rosalie Lemay for assistance with the zymographies. Partial funding from CIHR (grant no. NTA71855 and PRG 80137) is acknowledged. Oliver McIntyre was supported in part by Vanderbilt University Institute for Imaging Science (VUIIS, U24 CA 126588) and the Vanderbilt-Ingram Cancer Center. This work was supported by the National Cancer Institute of Canada (grant no. 016436).

**Chapitre 4. Impact of H-Aggregation on Activatable MMP-
2 Specific Probes for Optical Imaging**

Impact of H-Aggregation on Activatable MMP-2 Specific Probes for Optical Imaging

Auteurs de l'article: Réjean Lebel, Marc-André Bonin, Riadh Zriba, Adrianna Radulska, Witold Neugebauer, Martin Lepage

Statut de l'article : Accepté dans *Contrast Media and Molecular Imaging*; DOI 10.1002/cmmi.500

Avant-propos :

La contribution de l'auteur de cette thèse comprend la caractérisation (absorbance, fluorescence, agrégation) et le dosage des molécules, les essais d'activation et les essais de désagrégation, ainsi que 95% de la rédaction du manuscrit. Les tâches effectuées par les autres collaborateurs incluent la synthèse des molécules testées, la chromatographie de taille, que la spectroscopie de masse, et la rédaction de la section matériel et méthode de la synthèse.

Résumé :

Nous avons préparé un ensemble de sondes optiques, fonctionnalisées avec un groupement fluorescent Cy5 initialement atténué par un groupement absorbeur QSY21. Entre les deux, nous avons inséré différentes séquences peptidiques afin de trouver la meilleure candidate, en se basant sur la spécificité de la séquence, la vitesse d'activation et l'efficacité de l'atténuation initiale. La caractérisation des sondes nous a permis de constater qu'un phénomène d'agrégation hypsochromique se produit avec nos sondes en solvant aqueux et est causé par la présence de QSY21. Cette agrégation influence les propriétés optiques de nos sondes, et peut potentiellement influencer leurs propriétés en tant que substrat. Nous avons identifié un candidat très spécifique (**II**), mais dont l'activation est compromise par son importante agrégation.

Article inclus avec permission. R. Lebel *et al.* Contrast Media and Molecular Imaging (2012). © John Wiley & Sons, Inc.

Introduction

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of 24 zinc-dependant enzymes, which together can degrade virtually all extracellular matrix components (Yan et Boyd, 2007). MMPs can be secreted as inactive pro-enzymes and, because of the critical function they accomplish, multiple regulation mechanisms control their secretion, anchoring to cell membranes, activation (removing of the pro-domain) and activity (with endogenous inhibitor such as TIMPs) (Chakraborti *et al.*, 2003). While it has been the focus of much work, other functions such as the regulation of apoptosis and cell growth have been highlighted and reviewed (Egeblad et Werb, 2002). MMPs are involved both in physiological (wound healing, morphogenesis) and pathological (cancer, atherosclerosis) processes (Yan et Boyd, 2007). The importance of these enzymes is not only reflected by the impressive arsenal of MMP inhibitor (MMPi) developed over the years, some even tested in clinical trials (Coussens *et al.*, 2002), but also by the numerous publications describing new tools and methods for the detection of MMPs *in vivo* (for a review, see (Scherer *et al.*, 2008)). Positron emission tomography (PET) (Su *et al.*, 2005; auf dem Keller *et al.*, 2010), single photon emission computed tomography (SPECT) (Zhang *et al.*, 2008; Tavakoli *et al.*, 2011), magnetic resonance imaging (MRI) (Bazeli *et al.*, 2010; Hyafil *et al.*, 2010), near infra-red fluorescence (NIRF) imaging (Klohs *et al.*, 2009; Sheth *et al.*, 2010) were all recently used to detect the presence or activity of MMPs. While a complete review of the many publications on this topic is outside the scope of this paper, it is worthwhile to note that several probes have been successfully tested for *in vivo* MMP imaging in preclinical models.

The probes described in these references have a common feature: they do not target a single MMP, but instead are activated by several members of the family, a strategy which improves sensitivity, albeit at the cost of selectivity. This approach is clearly useful to assess the progression of pathologies known to involve many MMPs, such as ischemia (Klohs *et al.*, 2009), atherosclerosis (Shon *et al.*, 2011) and vascular remodelling (Zhang *et al.*, 2008). A limitation of such probes is revealed when the activity of an individual MMP must be assessed. It has been reviewed that MMPs with similar affinity (*e.g.*, MMP-2 and -

9) may have pro or anti-tumoral roles depending on the tumor model (Overall et Kleinfeld, 2006). Hence, it is clear that selective detection remains of utmost importance. Accordingly, several selective NIRF probes targeting, for example, MMP-7 (Scherer *et al.*, 2008) and MMP-13 (Lee *et al.*, 2008) were published in the last few years. We previously reported on a probe design able to detect the activity of MMP-2 *in vivo* using MRI (Lebel *et al.*, 2008). The aim of this work is to specifically detect MMP-2 activity using a NIRF probe.

Dyes emitting in the red and IR regions are commercially available (*e.g.*, Cy5, 5.5 and 7, AlexaFluor 647, 700 and 780, Quasar 670). Together with a quenching (absorber but non fluorescent) group, a Förster resonance energy transfer (FRET) pair can be created which will absorb light but will not emit fluorescence. A typical scheme includes FRET partners separated by a peptide sequence recognized and cleaved by the targeted enzyme(s). The advantage of dyes emitting in the IR region for *in vivo* imaging is the low absorbance of tissues at these wavelengths (Licha et Olbrich, 2005). However, other aspects of dyes should be considered, such as their solubility, since these probes will be used at relatively high concentrations (10^{-5} - 10^{-6} M).

Cyanine dyes are well known to form various types of aggregates when conditions favor their self interaction and self assembly (Behera *et al.*, 2007). Concentration, temperature, pH as well as the structure of the molecule can affect this phenomenon. The commercially available Cy5 is very soluble in water and is not expected to form aggregates. Cy5 was compared with several other molecules with similar optical behaviour by Berlier *et al.* (2003), who demonstrated the ability of Cy5 to self quench when bound to proteins in a high dye/protein ratio (Berlier *et al.*, 2003). Another study recently confirmed this phenomenon by labelling a polymer with an increasing number of Cy5 groups (Kang *et al.*, 2010). In both studies, hypsochromic aggregation (H-aggregation) resulted in a blue-shifted peak of the absorption spectrum. Such aggregates were also reported to be non fluorescent (Berlier *et al.*, 2003).

We selected Cy5 and QSY® 21 as FRET partners to build a set of four probes including peptide sequences specific for MMP-2 (Chen *et al.*, 2002) (Fig. 1). The selection was based both on the availability of these molecules and the absence of self quenching expected for molecules labelled with a single Cy5. We named this collection of probes M2AFP (*MMP-2* Activatable *F*luorescence *P*robes). We compared M2AFPs for their selectivity, quenching ratio and MMP-2 cleavage rate. Lukacova *et al.* have compared human MMPs and showed that the binding sites of MMP-2, 3, 7, 8 and 9 are very similar (Lukacova *et al.*, 2004), which guided our selection of enzyme to assess the specificity of our new probes. Several hurdles encountered during the characterization of our Cy5/QSY® 21 optical probes have not been reported in the literature of activatable probes, to the best of our knowledge. Herein, we present our results and the advanced characterization of our probes, discussing molecular aspects such as aggregation and absorbance in organic and aqueous media. We conclude that one of the candidate probes, namely compound (**II**), displays promising characteristics for *in vivo* imaging of MMP-2 activity.

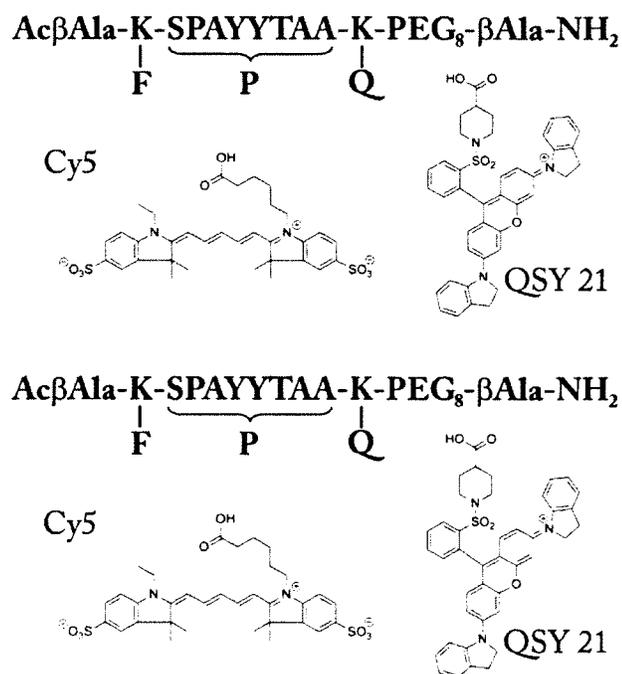


Figure 1. Structure of M2AFPs, Cy5 and QSY21. All probe molecules are based on the same structure (top). The identity of the fluorophore (F), quencher (Q) and peptide (P) are listed in Table 1.

Number	P	F	Q	Note
I	SPAYYTAA	Cy5	QSY® 21	Inspired by sequence B74P (Ref. 22)
I-s	SYPATAYA	Cy5	QSY® 21	Scrambled version of (I)
II	SLAYYTAA	Cy5	QSY® 21	Inspired by sequence B74 (Ref. 22)
II-d	SLAYYTAA	Cy5	QSY® 21	D-amino acids, control for (II)
III	PSWLLTAA	Cy5	QSY® 21	Inspired by sequence A13P (Ref. 22)
III-d	PSWLLTAA	Cy5	QSY® 21	D-amino acids, control for (III)
IV	SGAPSWLLTAA	Cy5	QSY® 21	Full A13P Sequence (Ref. 22)
IV-d	SGAPSWLLTAA	Cy5	QSY® 21	D-amino acids, control for (IV)
V	SPAY*	Cy5	None	(I) without quencher moiety
VI	*YTAA	None	QSY® 21	(I) without fluorophore moiety
VII	SPAYYTAA	Cy5	None	(I) lacking QSY® 21 (aggregation control)

Table 1. Identity of M2AFP groups. Bold letters in the sequence indicate the expected cleavage site. Controls (D-amino acid and scrambled versions) are not expected to be cleaved.

Material and Method

Chemicals

Standard chemicals (reagent grade) and solvents (HPLC grade) were used as received. DMF (dimethylformamide), IPA (isopropanol), and ACN (acetonitrile) were acquired from Fisher Scientific, DIPEA (di-isopropylethylamine), hydrazine and TIPS (tri-isopropylsilane) from Sigma-Aldrich, Fmoc amino acids and TFA (trifluoroacetic acid) from Chem-impex International, Piperidine from A&C, QSY® 21 NHS ester from Invitrogen and, finally, Cy5.0 mono NHS ester from GE Healthcare UK. ACS grade DCM (Fisher Scientific) was freshly distilled prior to use. TentaGel S RAM resin, 2-Cl trityl resin, and PyBOP (benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate) and HATU (2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl uronium hexafluorophosphate) were purchased from RAPP Polymere, Aapptec and GLS China, respectively.

Fmoc deprotection and coupling

Fmoc deprotection: The resin was treated with 50% piperidine in DMF (50 mL/g of resin) for 30 min, followed by successive washing with DMF 2x, DCM 3x, IPA, DCM, IPA, DCM, IPA, DCM 3x (Standard Washing Procedure, SWP). A Kaiser test was performed to confirm the deprotection of the resin.

Coupling: Manual and continuous flow coupling were used. For manual coupling, the resin was treated with a two fold excess of Fmoc amino acid, two fold excess PyBOP and four fold excess DIPEA in DCM (50 mL/g of resin). The mixture was shaken for 2 h and then the resin was washed using the SWP. For continuous flow coupling, the resin was loaded in the reaction column of the automatic peptide synthesizer (Pioneer Peptide Synthesis system, Applied Biosystems), and Fmoc amino acids were added in a 3x excess using HATU in the presence of DIPEA. A deprotection step was performed using 20% piperidine in DMF.

Synthesis of M2AFPs (I, II, III, IV) and their controls

Resin preparation and peptide sequence: M2AFPs were synthesized on TentaGel S Ram resin (0.046 mmol). The synthesis scheme was as follows: (1) The resin was submitted to the Fmoc deprotection procedure, (2) Fmoc- β -Ala residue, FmocPEG₈ and FmocLys(Dde) residue (L or D isomer depending on the sequence) were coupled manually as described above, (3) the resin was loaded in the reaction column of the automatic peptide synthesizer for continuous flow synthesis. Final Fmoc deprotection was performed manually. The deprotected peptidyl resin was agitated with a mixture of 15% Ac₂O/20% DIPEA/65% DCM (10 mL) for 15 min to cap the peptide with an acetyl at the N-terminal site. The resin was then washed using the SWP.

Quencher labelling: A quantity of 50 mg of peptidyl resin was further processed: Dde protection of the Lys (position 3) was removed with 2% hydrazine in DMF (2 mL) (6 times for 3 min) and the resin was washed twice using the SWP to completely remove any trace of hydrazine. This peptidyl resin was suspended in DMF (2 mL). DIPEA (40 μ L), QSY® 21 NHS ester (1 mg, limiting reagent) and HOBt (1 mg) were added, and the mixture was

agitated for 4 h. The resin was washed using SWP. The peptides were cleaved from the resin by treatment with 2.5% H₂O/2.5% TIPS/95% TFA for 30 min. The resin was removed by filtration and the filtrate was suspended in diethyl ether. The product was extracted 3 times with 10% aqueous acetonitrile. The combined aqueous phases were frozen in liquid nitrogen and lyophilised to obtain the crude peptide (blue solid). This peptide was purified by preparative HPLC (C18) and the collected fractions containing the peptide were combined and lyophilised to yield around 0.5 mg of pure QSY® 21 labelled peptide.

Fluorophore labelling: The purified peptide was solubilised in DMF (1.5 mL). DIPEA (40 μ L), Cy5.0 mono NHS ester (1 mg, four to five fold excess) and HOBt (1 mg) were added. The reaction mixture was stirred overnight, diluted with water (2 mL) and filtered on SPE C18 (supelco 1 mL tube, 100mg of C18 silica). The peptide was eluted with a minimal amount of 50% aqueous acetonitrile and the combined filtrates were directly purified by semi-preparative HPLC (0.75 mL of filtrate per run, Zorbax column eclipse XBS C18 250 mm x 9.4 mm) using a 25 min 0-70% ACN gradient, followed by a 5 min 70-100% gradient (flow of 1mL/min). The collected fractions of the pure peptide were lyophilized. The yield of the final compound (blue powder) was between 0.1 and 0.45 mg depending of the sequence. Purity was monitored using absorbance at 214, 230 and 650 nm, and was found to be >92% in all cases.

Synthesis of M2CFP (V)

M2CFP was synthesized on 2-Cl-trityl resin. The first amino acid was loaded on the resin (0.074 mmol) using a mixture of Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH (0.22 mmol) and DIPEA (0.22 mmol) in DCM (10 mL) for 2 h and then the resin was treated with MeOH / THF (10 mL, 1/3) in presence of DIPEA (0.2 mL) for 15 min to cap any residual active sites. The peptide sequence was then synthesized using the manual coupling / deprotection procedure as described above. The peptide was cleaved and extracted as described in the Quencher Labelling section above. (V) was purified following the same procedure as described for the M2AFP. A yield of 0.4 mg of pure peptide was obtained.

Absorbance and fluorescence spectra

All compounds synthesized were solubilised at 1 mM in DMSO. Measurement solutions were prepared at a concentration of 750 nM in 1X phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 or in methanol (MeOH). Absorbance spectra were measured with a Hitachi U-2010 Spectrophotometer (400-800 nm range, 2 nm steps, 2 nm bandpass) or on a TECAN infinite m1000 microplate reader (350-800 nm, 2 nm steps, 5 nm bandpass). This microplate reader was also used for fluorescence spectra acquisition. Emission (640-720 nm) was measured while exciting at 600 nm (10 nm bandpass, 2 nm steps), and excitation (610-675 nm) was measured while reading the emission at 700 nm (10 nm bandpass, 2 nm steps).

The absorbance was then measured as a function of concentration: (**I**) was diluted from a 1 mM DMSO solution into 50 μ M to 0.20 μ M solutions in PBS, and each solution was read as described. The absorbance also measured in presence of albumin: 1 μ M solutions of (**I**) containing between 0 and 50 mg/mL of bovine serum albumin (BSA) were prepared and read as described.

Enzymatic assays

Probes were prepared at a final concentration of 10 μ M in a digestion buffer (50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 50 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ and 20 μ M ZnCl₂). MMP concentration was adjusted at 20 nM in the corresponding wells (Active human recombinant MMP-2, -3, -7, -9, Calbiochem). Proteinase K (40 μ M) (Roche) was added in the positive control wells, while no enzyme was added for the negative control. Assays were performed at 37°C, measuring the fluorescence as a function of time for 6 h (Ex. / Em. : 646 nm and 667 nm). The absorbance of each well was read before the addition of the enzyme, and after the digestion (6 h). The fluorescence signal was corrected for temperature and detector fluctuations using the control wells. The plasmatic stability assay was performed as described above, but in 50% murine plasma (Innovative Research) / 50% digestion buffer, in presence of absence of the MMP inhibitor GM6001 (100 μ M) (Calbiochem).

Gel filtration assay, mass spectrometry and reversed phase HPLC.

The formation of oligomers was monitored using analytical gel filtration on BioSep-SEC-S 2000 column (300 x 7.80 mm) (Phenomenex). The column was connected to a HPLC system (Agilent 1100). A volume of 50 μ L of 50 μ M solutions of **(I)** and **(II)** in PBS were eluted using PBS at a flow rate of 1 ml/min. The elution time of these compounds was monitored using a detection diode array, and the absorbance between 200 and 1,000 nm was acquired. Independently, the m/z of **(I)** was determined using a Protein Chip Surface-Enhanced Laser Desorption-Ionization (SELDI) System, Personal Edition (Bio-Rad) using *alpha*-Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix. Reversed phase HPLC was performed either using a 10-70% CH₃CN gradient in H₂O over 30 min or a 0 to 100% MeOH gradient in H₂O over or 40 min (C18-column, Agilent ECLIPSE XDB-C18, 5 μ m, 4.6 x 250 mm) with a flow of 1 mL/min in both cases.

Results

Characterization and quantification of M2AFP probes

The probes were characterized in PBS 1X to approximate normal assay conditions. Figure 2a shows the relative excitation and emission spectra of **(I)**, **(I-s)** and **(V)**. The other M2AFPs had similar spectra. The excitation and emission maxima were found to be 648 nm and 666 nm respectively, which is in agreement with previous reports (Mujumdar *et al.* 1993). To quantify M2AFPs, we also acquired their absorbance spectrum in PBS (Figure 2B) and in methanol (Figure 2C). The spectra from M2AFPs presented in Figure 2B diverge from that of Cy5 (**V**): An important peak appears at 605 nm, and the optical behaviour of each M2AFP varies noticeably, between themselves, and when compared with an equimolar solution of **(V)** (labelled with Cy5) mixed with free QSY® 21. Interestingly, the corresponding spectra in methanol were similar to the absorbance of **(V)** (Figure 2C).

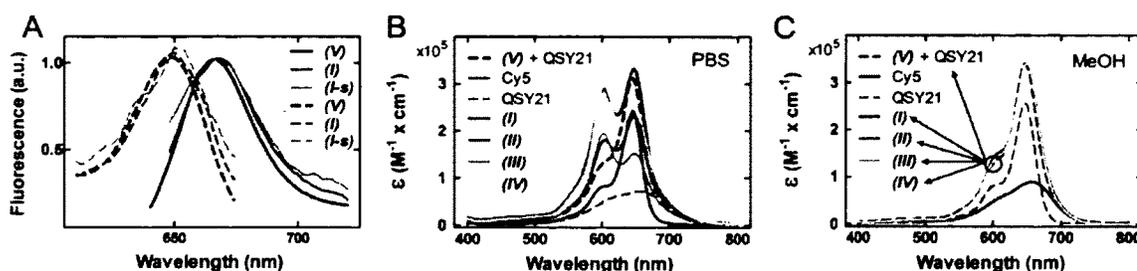


Figure 2. Absorbance and fluorescence spectra of M2AFP probes. (A) Emission and excitation spectra of probes in PBS. All curves were normalised at their maximal fluorescence value. Noise in the I and I-s curves is explained by the very low signal available due to quenching. The absolute fluorescence intensity (I; 282 a.u. vs I-s; 123 a.u.) is in agreement with the expected quenching values (Table 2). (B) Absorption spectra of M2AFPs in PBS (PBS spectra were corrected using MeOH measured concentrations). As can be seen, absorption of I, II, III, IV and their control is different from the absorption of an equimolar solution of Cy5 and QSY® 21 (V and QSY® 21). Interestingly, a second peak appears at 605 nm, which we attribute to the well known H-band blue-shifting of fluorescence caused by the dimerization of dyes. (C) Spectra in MeOH present the expected shoulder for Cy5 and Cy5 functionalized molecules, but lack the peak observed in PBS. This result suggests that dimerization does not occur in MeOH.

Probe	Fluorescence (a.u.)		Quenching efficiency
	F _i (Ctrl-)	F (Prot. K)	
<i>I</i>	316	10297	96.9%
<i>I-s</i>	180	10981	98.4%
<i>II</i>	230	9838	97.7%
<i>II-d</i>	114	9838*	98.8%
<i>III</i>	68	10719	99.4%
<i>III-d</i>	102	10719*	99.1%
<i>IV</i>	58	10467	99.4%
<i>IV-d</i>	58	10467*	99.4%

Table 2. Quenching efficiency. M2AFP probes were incubated with (Ctrl+) or without (Ctrl-) proteinase K. Quenching efficiency was calculated using equation 1. Ctrl+ values for D-amino acid probes and indicated by (*) are based on their digested (unquenched) L-amino acids counterpart.

Additional qualitative information was obtained during the preparation of our probes. A precipitate was visible in some M2AFP solutions (particularly *II*) when prepared in PBS at high concentrations (*e.g.*, 100 μ M); this was not the case for Cy5 and *V*, but QSY® 21 was difficult to dissolve in PBS as well. Cy5 and QSY® 21 and all of our probes were readily soluble in methanol. Overall, these results suggest that QSY® 21 may be responsible for the aggregation, and that this aggregation in turn results in an H-band

absorbance near 605 nm. Further investigation showed that the maxima were slightly red-shifted, from the 648 nm peak which was expected for Cy5 based agents (Supplementary material, Figure S1).

In order to accurately dose our probes, we compared the absorption of Cy5 and QSY® 21 in MeOH to that of *(V)* and *(VI)* respectively, and found no discrepancy in the shape of the spectra (Figure 2c). Following this observation, we further assumed that the absolute intensity of the spectra of Cy5 and QSY® 21 attached to our probes were relatively unchanged by the presence of the other components (amino acids, PEG₈). A solution of 1 μM of *(V)* and 1 μM of QSY® 21 was prepared, the absorbance spectrum relative to the maximum was found to superimpose with that of individual *(I to IV)* solutions. We used the absorption of the 1 μM *(V)*/QSY® 21 solution in MeOH to calculate the extinction coefficient of our probes ($\epsilon_{650} = 340\,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$).

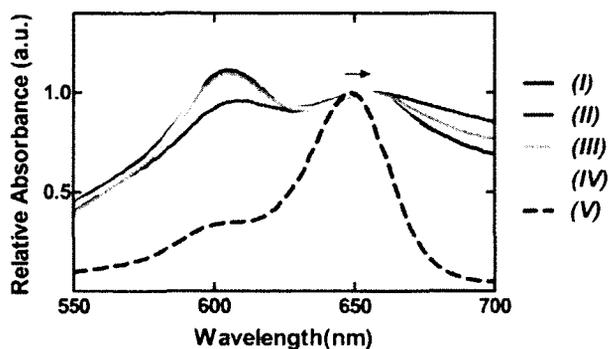


Figure S1. Spectra of *(I)* to *(IV)* compared to the spectrum of *(V)* after 6 hours in digestion buffer (no enzyme). All spectra are relative to the maxima in the 640-675 nm range. In addition to the peak at 605 nm, there is a small red-shift (arrow) in the expected peak at 648 nm. H-aggregation predicts that in addition to the blue-shifted peak (605 nm) representing a transition dipole component of higher energy than the monomer (648 nm), an

additional lower energy state (component) can also be present (*(I)*, *(III)* and *(IV)* at 654 nm, *(II)* at 658 nm), but only if an angle is present between the stacked dipoles (the molecules are not aligned completely parallel).

Evaluation of M2AFP quenching efficiency

In order to evaluate the efficiency of the FRET quenching in the M2AFPs, we prepared a digestion assay using a very high concentration of proteinase K (40 μM). This broad spectrum serine protease cleaves peptide bonds adjacent to the carboxylic group of aliphatic and aromatic amino acids (Ebeling *et al.*, 1974). Complete digestion was observed within seconds. As reported in Table 2, a very important fluorescence increase was detected for

every probe. The quenching (Q) efficiency of each probe was obtained using the intact (F_i) and cleaved (F) fluorescence values:

$$Q = 1 - \frac{F_i}{F} \times 100\% \quad [\text{eq.1}]$$

Control D-amino acids probes could not be digested. Their quenching efficiency was calculated using the fluorescence value F of their activated L-amino acid counterpart. Quenching efficiency varied between 96.9% and 99.4%. It may be noted that the final fluorescence after digestion is very similar for all cleaved M2AFCP (10460 +/- 434 a.u., a 4.14% standard deviation), which confirms that the final concentration of unquenched Cy5 is similar in all samples, and that quantification in methanol was accurate. It also confirms that our estimation for the quenching of the D-amino acid is reasonable.

Comparison of peptide sequences to optimize M2AFP probes MMP-2 digestion and specificity

In order to select the optimal peptide sequence for our M2AFPs, we compared the digestion by MMP-2, -3, -7 and -9 of **(I)** to **(IV)**, which include four different peptide sequences. All kinetic curves were measured simultaneously and corrected using the appropriate positive (proteinase K) and negative (no enzyme) controls. Figure 3 shows the digestion of **(I)** to **(IV)** by MMP-2 as a ratio of total activation as measured in the positive (proteinases K) control. **(I)** was the best substrate with a digestion reaching 97.5%, while the digestion of **(III)** and **(IV)** levelled around 80% and 90%, respectively. The digestion of **(II)** was found to be slower and did not reach a plateau after 6 h of digestion (59%). The D-amino acid controls were not activated by MMP-2, by any other MMP trialed, or even by proteinase K.

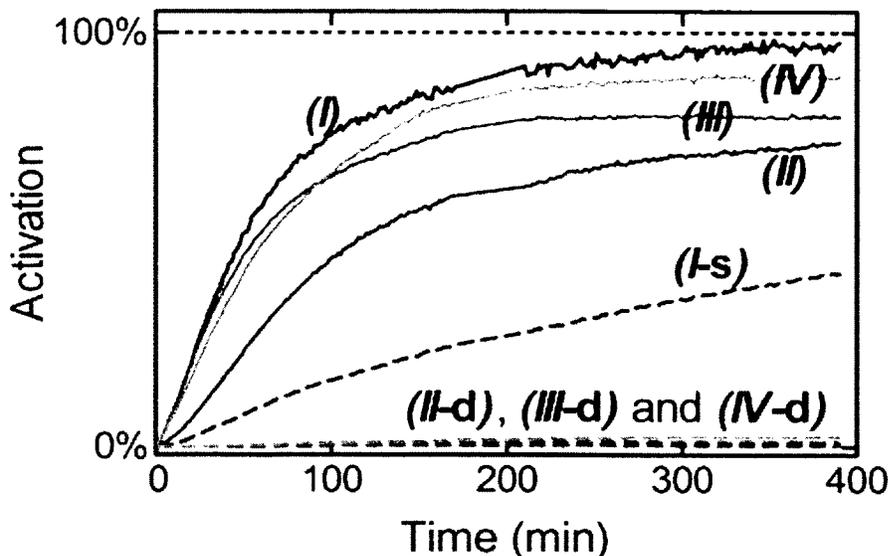


Figure 3. Digestion of 10 μM of our compounds with 20 nM MMP-2 as a function of time. I, III and IV are degraded faster, while II is cleaved more slowly. Only I is almost completely degraded after 6 h (98%). Control probes (D-amino acids) were not degraded at all, while I-s, the scrambled version of I, was slowly cleaved by MMP-2.

We calculated the initial velocity (v_i) of the enzymatic reaction in order to obtain a first order approximation of k_{cat}/K_m with the Michaelis-Menten equation:

$$v_i = \frac{V_{\text{Max}}[S]}{K_M + [S]} \approx \frac{k_{\text{cat}}[E][S]}{K_M + [S]} \approx \frac{k_{\text{cat}}[E][S]}{K_M} \quad [\text{eq. 2}]$$

These approximations are justified in the quasi-steady-state, if the free enzyme concentration roughly equals the total enzyme concentration, $[E] \approx 20\text{nM}$, and the substrate concentration, $[S] = 10 \mu\text{M}$, is well below the expected K_M . The K_M for the peptide sequences of (I) to (IV), as measured by Chen *et al.*, ranged between 600 and 1300 μM (Chen *et al.*, 2002), warranting this last approximation. Values of k_{cat}/K_M found in this work are lower than those for the pure peptides (Chen *et al.*, 2002) (Table 3).

The activation of (I) and (II) by MMP-2, -3, -7 and -9 as a function of time is shown in Figure 4A and 4B, respectively. While enzymatic cleavage by MMP-2 was more efficient, the other MMPs could cleave the probes to some extent. (II) was found to be the most specific probe, even towards the other gelatinase MMP-9. (III) to (IV) were also tested, the initial velocity of their degradation were fitted, and k_{cat}/K_M values reported in Figure

4C. These results indicate that **(II)** is the most specific probe, albeit with the slowest activation kinetics.

Probe	MMP-7		MMP-3		MMP-9		MMP-2	MMP-2 k_{cat}/K_M (Chen <i>et al.</i> , 2002)	Digest 6 h
	k_{cat}/K_M	R	k_{cat}/K_M	R	k_{cat}/K_M	R	k_{cat}/K_M		
I	5.6E2	6%	1.2E3	13%	1.8E3	19%	9.5E3	4.4E05	98 %
II	3.3E2	8%	8.8E1	2%	1.5E2	4%	3.9E3	2.8E05	59 %
III	1.1E3	13%	2.4E2	3%	1.9E3	22%	8.7E3	5.1E05	80 %
IV	9.0E2	12%	1.9E2	3%	1.6E3	21%	7.4E3	5.1E05	90 %
I-s	3.1E0	-	4.5E2	-	1.9E2	-	1.3E3	-	-

Table 3. Calculation of k_{cat}/K_M using the initial velocity, and specificity ratios (R) compared to MMP-2. k_{cat}/K_M in [M of product] \times [M⁻¹ of enzyme] \times [M⁻¹ of substrate] \times [s⁻¹] of the digestion of M2AFPs with MMPs and V_i ratio compared with MMP-2. The most specific probe is **(II)**, which showed an outstanding specificity toward MMP-9 (5%) while all other probes displayed important digestion by MMP-9 (roughly 20% compared with MMP-2). All D-amino acid control probes **(II-d)** to **(IV-d)** were not activated in these conditions (<2% digestion after 6 hours). Results are compared with k_{cat}/K_M values reported by Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2002) for the MMP-2 digestion of peptides from which our probes were derived.

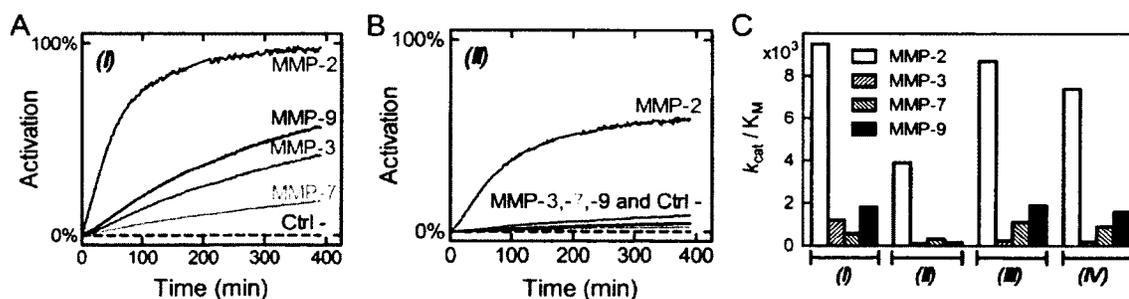
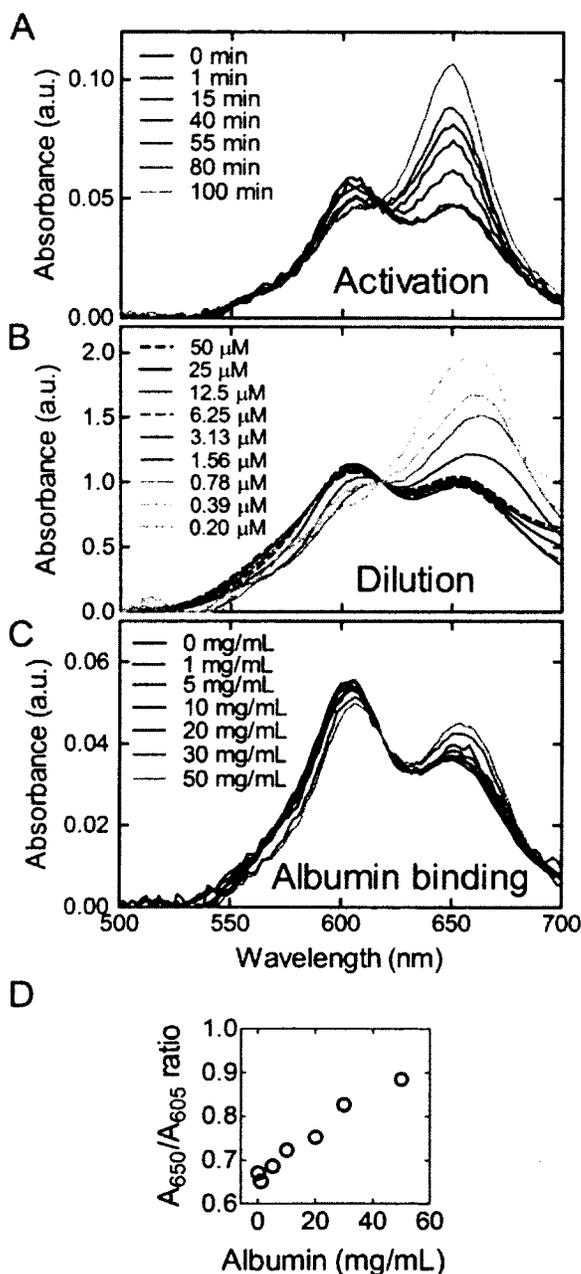


Figure 4. MMP specificity of M2AFPs. Digestion of 10 μ M of (A) I and (B) II with MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 (20 nM). MMP-2 cleaves its substrates quickly, while the probes are processed slowly by the other MMPs. The results are presented as a percentage of total digestion as measured with proteinase K. (C) k_{cat}/K_M values calculated from initial activation velocities (ni) for probes I to IV.

Confirmation of the formation of dimers

The absorption spectrum of (**V**) was similar to that of Cy5, but (**I**) to (**IV**) displayed a strong absorption peak located at 605 nm. We hypothesized that QSY® 21 may be responsible for this additional absorbance peak. In fact, (**I**) without QSY® 21 lacked this particular spectral feature (compound (**VII**), data not shown). In order to confirm this, we



performed an enzymatic cleavage of M2AFPs and measured the absorption spectrum as a function of time. The results for (**I**) are presented in figure 5A; similar results were obtained with (**II**) to (**IV**) when digested with proteinase K (data not shown).

Figure 5. Indirect proof of the dimerization of I. (A) Digestion of (I) by MMP-2 over 100 min caused a shift from a 605 nm peak dominated spectrum toward a 646 nm peaked spectrum. (B) Reducing the concentration of I caused a shift in the shape of the spectrum, but only at very low concentrations. (C) Absorbance of I as a function of added BSA concentration. All curves of (C) were adjusted relative to the absorption at 618 nm. The small shift detected in (C) is displayed in (D) using the ratio of the absorbance values at 650 nm and 605 nm.

One can clearly see that the H-band near 605 nm is reduced while the 648 nm peak is restored as a function of digestion time. It may be argued that direct QSY® 21 to Cy5 interactions are in cause. In order to test this possibility, we performed a

dilution assay, which should only affect the rate of intermolecular interactions, and not of intramolecular interactions. The absorption peak red-shifted back to 648 nm upon dilution, further supporting that dimerization could be responsible for the initial blue-shifted peak (figure 5B). We tested whether self aggregation of our probes could be countered by adding BSA to the solutions. Concentrations up to 50 μM BSA were tested (Figure 5C), but only a marginal effect was observed. The intensity ratio of the main (648 nm) and H-band (605 nm) absorption peaks allows one to appreciate the small but visible shift (Figure 5D).

Gel filtration assays

The validity of our hypothesis concerning the formation of dimers or higher order oligomers by M2AFPs was further assessed with a gel filtration assay on **(I)** and **(II)** where absorption spectra were recorded during elution. Figure 6A shows the result of the elution of **(I)**. Three peaks appeared at retention times of 10.2, 10.7 and 11.2 min, corresponding to three entities of decreasing mass/volume. The individual absorbance spectra of the gel filtration peaks are reported in figure 6B. The spectra of the two first peaks are similar, and in accordance with the results obtained previously with **(I)**, with an important H-band at 605 nm. The spectrum of the last peak (hence the smallest entity) was similar to that of Cy5. We tentatively assigned the peaks at 11.2, 10.7 and 10.2 min to monomer, dimer and trimer forms, respectively. It can be seen from the individual spectra that the dimer (dotted line) has a higher absorption at 605 nm than the trimer (full line). This is also reflected in the dilution experiment, where we first observed a slight increase in the absorption at 605 nm while decreasing the concentration from 50 μM to 12.5 μM , then a decrease of this peak in favour of the 648 nm peak from 12.5 μM to 0.2 μM - which might indicate the equilibrium shifting from trimers to dimers, and then monomers. The analytic HPLC spectrum of **(I)** showed 2 small impurities corresponding to 3.0% or 4.7% of the area under the curve (AUC) at 214 nm, which were eluted ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ gradient) slightly before the main peak (92.3%). These impurities were not visible at 600 nm (main peak AUC > 98%), using either ACN or MeOH to elute (Figure 6C). A mass spectrum from a water solution was obtained using SELDI (up to 10 kDa, Figure 6D), where the monomer (3007 Da), dimer and trimer aggregates were detected.

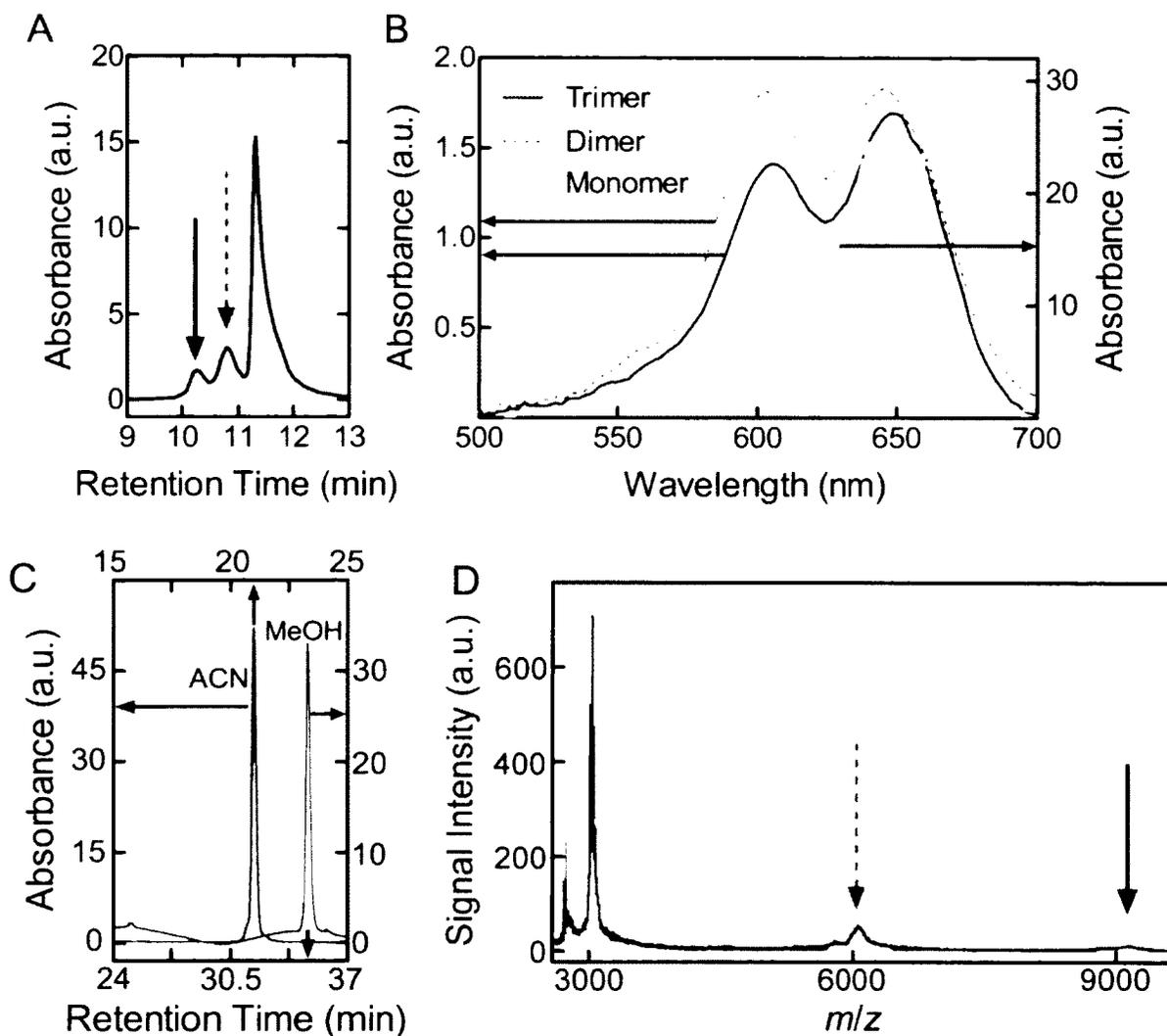


Figure 6. Gel filtration, reversed phase HPLC and mass spectrum of (I). (A) Three peaks were detected during the gel separation of (I) in PBS while monitoring at 600 nm. The absorption spectrum of each peak was measured (B), and we assigned the peaks to the monomer (dashed line, RT=11.2 min), dimer (dotted line, RT=10.7 min) and trimer (full line, RT=10.2 min) forms. The spectrum for the monomer was plotted using the right axis because of its high intensity (arrows indicate the axis for each curve). II yielded similar results (data not shown). (C) Reversed phase HPLC using either ACN or MeOH for elution confirmed that product (I) contained no impurities visible at 600 nm which could explain the two minor peaks observed in A. (D) Mass spectroscopy detected I (~3007 Da) and its dimer (~6014 Da) and trimer (~9021 Da) aggregates.

Plasma stability assay

The plasma stability of (*I*) and (*II*) was tested. The results (Fig. S2) show that unspecific cleavage occurs at a low rate, corresponding to roughly 2 nM MMP-2 (comparison of the slopes between the activation kinetics of the probes in plasma or 20 nM MMP-2). Interestingly, the signal of (*I*) was found to increase by two fold immediately upon the addition of plasma when compared with a control sample, while the signal of (*II*) remained unchanged. The addition of GM6001 had no effect on the plasma activation of the probe (data not shown), showing that this slow activation is unspecific.

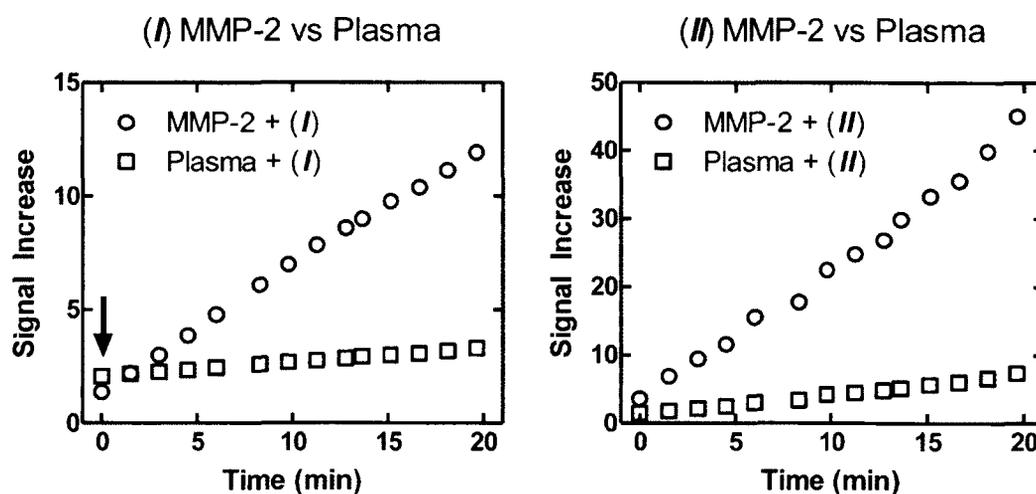


Figure S2. The signal reported here is relative to the inactivated control. Comparing the slope of the activation kinetics, it was found that the unspecific signal increase corresponded to roughly 2 nM of MMP-2. Also, diluting (*I*) in plasma immediately increased the signal by 2x, while the signal of (*II*) was not visibly affected. This can be seen at the initial time point (black arrow).

Discussion

Several MMP probes have been developed over the years including probes based on potent MMP inhibitors and activatable fluorescent probes based on MMP specific substrates. To our knowledge, at least one fluorescent MMP probe has been commercialized, and is

activated by MMP-2, -3, -7, -8, -9, -10, -12, -13, -14, -15, -16 (Klohs *et al.*, 2009). Such a broad spectrum MMP probe may be tremendously useful to detect bulk MMP activity, but targeted probes are likely to be necessary to identify specific roles of individual MMPs in inflammation, cancer and matrix remodelling. We were interested in developing a MMP-2 specific probe because of the importance of this enzyme in tumor invasiveness. We prepared probes based on MMP-2 specific peptide sequences (Chen *et al.*, 2002), and incorporating the Cy5/QSY® 21 FRET pair. A similar strategy has been successful in detecting caspase 3 activity (Bullok et Piwnica-Worms, 2005; Debunne *et al.*, 2011) and MMP-7 (Pham *et al.*, 2004).

Initial attempts to quantify the concentration of our probes by analysing their absorption in PBS failed due to important variations of the shape and intensity of the spectra of the different compounds. We observed that the absorption varied significantly depending on the peptide sequence, the method of preparation and even the incubation time, as observed by a loss of absorbance near 648 nm and an increase near 605 nm and a red-shift of the 648 nm peak. In extreme cases, this led to a complete denaturation of the absorption spectrum (Figure 7, 1 week old solution). Overall, aggregation in aqueous media prevented direct quantification of our probes in PBS. However, spectra acquired from MeOH solutions allowed precise quantification. This was confirmed by the similar fluorescence levels measured after complete digestion of each probe with proteinase K. Using MeOH quantification as a standard, we found that PBS quantification led to an underestimation of concentration up to 83% (*II-d*) when considering the absorption at 648 nm (data not shown). The principal limitation of MeOH quantification is that only initial solutions can be quantified since the buffer for enzymatic cleavage assays are water-based. Then, aggregation in aqueous solutions makes sample to sample correction virtually impossible. Additionally, M2AFPs must be kept in organic solvent (in our case, DMSO was preferred) in order to prevent unwanted and sometimes permanent aggregation, which occurred at high concentrations.

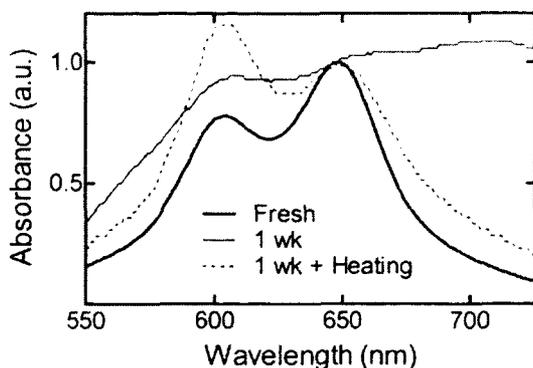


Figure 7. Spectra of II solutions, either freshly prepared from DMSO (Black full line), or prepared from a 1 week old 50 μ M solution in PBS (full gray line). Heating the second solution partly restores the H-aggregation absorption band. All absorbance are relative to A648.

H-aggregation of Bis(indolenyl)pentamethincyanine dyes, including that of the sulfonated Cy5, has been studied recently by Kang *et al.* (Kang *et al.* 2003). These authors forced the dimerization of Cy5 by conjugating dye monomers to a PAH (Poly(allylamine)) polymer. While the PAH-Cy5 fluorescence excitation spectrum of the resulting molecule did not appreciably vary from the Cy5 excitation spectrum, the authors observed an important absorption shift from 638 nm to 588 nm in their conditions. We observed a comparable shift with M2AFPs probes (648 to 605 nm). The addition of organic solvents, expected to dissolve dye aggregates, resulted in the disappearance of the absorption H-aggregation band for M2AFPs (Figure 2B) and PAH-Cy5. Kang *et al.* concluded that their H-aggregates did not fluoresce. Interestingly, the M2AFPs with the greatest 605/648 nm peaks intensity ratio also showed the most appreciable quenching (99.4% of quenching for both **(III)** and **(IV)**, respectively, corresponding to a fluorescence increase of 167x). Thus, it would appear that Cy5 in close proximity results in fluorescence quenching in our probes.

The fluorescence of probes **(I)** and **(II)** was found to be quenched at 96.9 and 97.7%, respectively, corresponding to a fluorescence increase of 33x and 43x. For comparison, the activation of the commercial probe MMPsense™ 750 (Perkin Elmer) is reported to result in a 25x fluorescence increase (Groves *et al.*, 2012). Hence, the quenching of all of our probes was deemed satisfying. Of note, H-aggregation and the further reduction of fluorescence is beneficial to the purpose of our probes, but the quantification of the impact of H-aggregation on the fluorescence of our probes was beyond the scope of this work. Also, given the high concentration of unspecific binding partners *in vivo* (such as albumin, 30-50 mg/mL in human blood), it is likely that aggregation quenching may not be reliable since unbinding would result in "false" activation – indeed, when comparing the quenching

efficiency of (**II**) in digestion buffer or MeOH, a 0.6% quenching efficiency difference was found (data not shown). This difference, which could be partially caused by aggregation, translates in a 8x signal difference. The plasma stability assay presented in Fig. S1 clearly shows that diluting (**I**) in plasma immediately doubled the signal of the probe, while the signal of (**II**) was not affected – in agreement with their respective aggregation potential. While PAH-Cy5 molecules were designed to result in dye aggregation, M2AFPs were not. To our knowledge, the aggregation of QSY® 21/Cy5 based probes has not been reported before. Our results suggest that this phenomenon may greatly impact on quenching efficiency, probe quantification in aqueous media and enzymatic degradation of all probes based on this FRET pair. We showed that Cy5 moieties are in close proximity of each other. We now examine the mechanism responsible for this aggregation. We observed that compound (**V**) and (**VII**), which correspond to (**I**) without the QSY® 21 moiety or group, respectively, do not aggregate. Xanthene dyes derivatives, such as QSY® 21, rhodamine (6G and B), fluorescein and halofluorescein dyes are known to produce aggregates. While the precise determinants of these self interactions vary from one molecule to the other, hydrogen bonding through the solvent was found to be a common feature in the aggregation of xanthene dyes in aqueous media. Since QSY® 21 is substituted with two indoline groups (2,3-dihydro-1H-indole), which are aromatic, it is likely that hydrophobic interactions play a major role as well. This previous knowledge of xanthenes dyes and our results indicate that the aggregation in aqueous solution is caused by QSY® 21. We also observed that (**II**) agglomerates more efficiently than (**I**), implying that the peptide sequence played a secondary role in the aggregation of our probes, i.e. stabilizing the interactions between probe molecules.

Dimerization and aggregation can cause steric hindrance, limiting the possibility for enzymes to bind and cleave their substrate. While this would beneficially increase plasmatic stability, it would also prevent the activation of M2AFPs by MMP-2. Aggregation of (**II**) was suspected from visual inspection of one week old 50 μ M solutions, which precipitated after 24 hours at 4°C, as opposed to (**I**) solutions of similar concentrations which remained clear. The difference in aggregation levels would explain the very slow degradation rate for (**II**) compared to (**I**). It should be noted that the H-

aggregation absorption band from **(II)** was weaker than that of **(III)** or **(IV)** (Figure 2B), yet it displayed a slower cleavage rate. We hypothesize that **(II)**, and to a lesser extent **(III)** and **(IV)**, eventually form large aggregates, which are different from H-aggregates, at least in their optical behaviour, and would result in a slower activation rate and an incomplete hydrolysis after 6h. This hypothesis was formulated based on the results of a one week incubation of **(II)**, for which the absorption spectrum had a low and monotonous intensity between 600 and 750 nm and lacked the 605/650 nm peaks features (Figure 7). In the case of **(II)**, disrupting these large aggregates with heat regenerated H-aggregates. Together, these results indicate that incomplete degradation can compromise the measurement of the quenching ratio of a probe and that care must be taken to ensure very efficient cleaving conditions, or complete degradation must be independently confirmed.

M2AFPs specificity, quenching and cleavage rate by MMP-2 were compared in order to select the best candidate for future *in vivo* experiments. **(I)** was found to be activated more readily by MMP-2, but also by other MMPs, and this might lead to important non specific activation *in vivo*. Its initial fluorescence is also higher than for the other candidates (less efficient quenching), and this might lead to higher fluorescence background. **(III)** and **(IV)** have excellent quenching ratios and are activated almost as quickly as **(I)** by MMP-2. On the other hand, both also suffer from a lack of specificity, similarly to **(I)**. Comparing the results from **(III)** and **(IV)**, we observed that using a longer peptide sequence did not result in the expected improvement of the efficiency of MMP-2 digestion (k_{cat}/K_M estimates are 3.1E3 and 2.6E3, respectively), but an improvement of the overall digestion after 6 h was noted (Table 3, compare **(III)** and **(IV)**, which are digested up to 80% and 90% respectively). We attribute this improvement to a reduction of H-aggregation as measured by absorbance (Figure 2B, compare **(III)** and **(IV)** curves - 605/648 nm peak intensity ratios also confirm the lower aggregation of **(IV)**). It is conceivable that a reduction of aggregation results in an increased substrate availability for the enzyme. The aggregation of **(II)** might constitute a problem for *in vivo* imaging. It is possible that storing this probe in DMSO until the moment of injection and using an appropriate injection formulation (*e.g.*, 5% DMSO), would likely prevent aggregation. While binding to BSA was shown here to have a small effect on the dimerization of our compounds, the massive concentration of

potential binding partners upon entering the bloodstream is likely to prevent self aggregation and ease the activation of **(II)** by MMP-2. Hence, **(II)** is a very interesting candidate, which fulfilled our initial requirement for specificity and was activated at a satisfying rate ($3.9\text{E}3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). As a comparison, we estimated $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ of the MMPsense™ 750 Fast probe for MMP-13 (fastest MMP tested) to be $2.8\text{E}2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Supplementary Material, Annexe 1). It must be noted that while our probe could potentially generate a slightly higher signal/contrast ratio because of its superior quenching (MMPsense™ 750 Fast is quenched by 96%, a 25x fluorescence increase), it can be activated only by a single MMP. *In vivo* preliminary experiments will be required to make a final selection. Plasma stability assays of **(I)** and **(II)** revealed their relative stability (Fig. S1), which supports further development based on these probes.

Conclusion

Several potential candidate probes for the optical fluorescence imaging of MMP-2 activity were synthesized and tested *in vitro*. Three parameters (quenching ratio, MMP-2 cleavage rate and activation specificity) were characterized and compared. Overall, **(II)** was found to be the most interesting candidate by virtue of its specificity. While its quenching and activation rate are lower than those of other candidates, they were found to be sufficient when compared with the characteristics of the commercial probe MMPsense™ 750 Fast. The impact of dimerization, H-aggregation and other aggregation of our probes were related to all three parameters – but further investigation will be necessary to better understand these relationships. Strong self interaction was accompanied by a higher specificity and slower activation kinetics. Quenching was found to be higher with probes **(III)** and **(IV)**, which displayed more extensive H-aggregation than **(I)**, but not than **(II)**. Care should be taken when quantifying Cy5/QSY® 21 based probes as their dimerization and agglomeration may lead to important variations in their absorbance spectrum: Organic solvents should be used to perform quantification. Whenever possible, the impact of aggregation (or disaggregation) of optical probes needs to be considered for probe quantification during *in vivo* imaging. Complete digestion of our probes with MMP-2 was prevented by probe aggregation in saline or in ethanol solutions. Given these limitations,

positive controls should consist of highly efficient cleaving conditions in order to prevent underestimation of the quenching efficiency.

Acknowledgments

ML is the Canada Research Chair in Magnetic Resonance Imaging and is member of the FRSQ-funded Centre de recherche clinique Étienne – Le Bel. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (grant no. 015605). RL was supported by a NSERC – Alexander Graham Bell Canada Graduate Scholarship. We would like to thank Anna Kwiatkowska and Samia Ait-Mohand for their assistance with mass spectroscopy and HPLC, Brigitte Guérin and Dave Boucher for insightful discussions and Jean-Bernard Denault for access to the TECAN m1000 plate reader.

References

Chapitre 5. MRI and Optical Imaging Monitoring of Tumor Response to Radiotherapy

MRI and Optical Imaging Monitoring of Tumor Response to Radiotherapy

Auteurs de l'article: Réjean Lebel, Heidi Ligeret, Freddy Rivault, Marc Massonneau, Martin Lepage

Statut de l'article : Soumis dans Molecular Imaging

Avant-propos :

La contribution de l'auteur de cette thèse comprend 95% des manipulations présentées dans ce manuscrit, ainsi que 85% de la rédaction du manuscrit.

Résumé :

Nous avons effectué le suivi de la croissance tumorale dans un modèle de tumeur mammaire murin (MC7-L1) avec ou sans radiothérapie (dose unique de 30 Gy au scalpel gamma). Pour ce faire, nous avons utilisé une sonde optique non spécifique de poids moléculaire intermédiaire (~6 kDa) en comparaison avec l'imagerie par résonance magnétique. Notre suivi nous a permis d'effectuer des mesures précises de la taille des tumeurs non irradiées, mais l'inflammation causée par la dose de radiothérapie a augmenté la captation non spécifique au niveau de la peau irradiée de nos animaux, affectant nos mesures. Ceci indique que l'imagerie optique n'est pas une modalité optimale pour le suivi de la taille des tumeurs dans le cadre d'une radiothérapie – et qu'en général, l'influence de la captation non spécifique peut grandement perturber l'acquisition du signal spécifique d'une sonde fluorescente.

Introduction

Imaging has become a ubiquitous tool in cancer research (Weissleder et Pittet, 2008). Macroscopic imaging modalities such as computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI) and ultrasound (US) are now widely used in preclinical research and clinical practice as they provide anatomical and physiological information on cancer. To provide further insights into tumors characteristics, several molecular imaging strategies using positron emission tomography (PET), single-photon-emission computed tomography (SPECT) and optical imaging (OI) have been developed over the last two decades. Obtaining complementary information on biological processes inside tumors is of paramount importance for the improvement of cancer prognostics and treatments. OI is a non-invasive imaging modality that monitors the behaviour of bioluminescent and fluorescent reporters and probes in living organisms (Hickson, 2009). Fluorescent probes for *in vivo* applications are designed to emit light in the near-infrared range (NIR; 650-950 nm) because absorption by biological tissues is weakest in that range (in particular haemoglobin).. In preclinical research, this technology has been extensively used to monitor tumor progression, metastasis appearance and efficiency of anti-cancerous agents. Clinical application of OI remains a challenge due to the limited penetration depth of photons. Nevertheless, the development of embedded systems (i.e. endoscopy) will allow the scientific community to tap into the enormous potential of OI for clinical imaging ((Kim, 2009) and references therein).

In tumor tissues, rapid and anarchic angiogenesis generates highly permeable blood vessels, enabling the extravasation of large circulating macromolecules and liposomes. In parallel, the lymphatic system grows too slowly to drain these molecules leading to their retention in the interstitium of the tumor area. This effect is called the enhanced permeability and retention (EPR) effect. The EPR effect is now widely exploited for the delivery of anticancer drugs because it usually increases local drug concentration in tumors by as much as 10 to 30 fold when compared to blood concentration (Vicent et Duncan, 2006; Maeda *et al.*, 2009).

In this study, we imaged tumor growth using a PEGylated near-infrared fluorescent probe that accumulates in tumor through the EPR effect. We compared OI to calliper and MRI measurements in terms of their capability to assess tumor growth and response to radiotherapy. We established a method to improve data interpretation of OI results and observed that modifications to the EPR effect can greatly impact the biodistribution of the probe. We conclude that the EPR effect should be taken into account in each study where tumors are imaged using a molecular probe and that macroscopic and molecular imaging modalities should be used in parallel as complementary modalities.

Material and Methods

Mouse Model

All animal experiments and procedures were approved by the ethics committee for animal research of the Université de Sherbrooke. All animals were kept under normal diet, in a 12h light/dark cycle with free access to water, including between probe injection and optical imaging. Balb/c mice were injected subcutaneously with 1×10^7 MC7-L1 (mouse mammary ductal carcinoma) cells suspended in 0.1-0.15 mL phosphate buffered saline over the left and right hind limb. The tumors were monitored biweekly until they reached a diameter of roughly 3.5 mm. During imaging and inoculation, the animals were under isoflurane anaesthesia (1-1.5%) and their body temperature was kept around 37°C using a warming pad.

QEPR-1.8 pharmacokinetics and distribution

Pharmacokinetics study were carried out on 3 Balb/c mice that were injected (1 minute bolus) with 1 nmole of QEPR-1.8 (QUIDD, France) solubilised in 100 μ L saline, followed by a flush of 100 μ L (saline). Animals were placed in a QOS imager (QUIDD Optical System, QUIDD, France) 3 at a time, and imaged using appropriate filters. White light images were acquired without excitation filters and two emission filters (716/40-25 and 740/13-25, Semrock, New York, USA), while fluorescence images were acquired using two excitation filters (655/40 and 684/24-25) and the same emission filters. Images were acquired before and after QEPR-1.8 injection, starting with imaging every 5-10 minutes in the first hour, then every 30 minutes for the following hour. Additional acquisitions were

performed at 7, 14, 24, 48 hours, but the animals were left to awaken and recover between these imaging sessions. A biodistribution study was performed on 2 Balb/c mice injected with QEPR-1.8, and one saline-injected mouse as a control. All animals were euthanized (CO₂) 24 hours post-injection and organs of interest were removed and imaged.

Tumor growth monitoring

Six Balb/c mice were injected QEPR-1.8 on days -6 and -2, +2, +6, +10 and +15 (day 0 is the day the tumors were irradiated). Twenty four hours later, fluorescence images were acquired. The animals were also imaged by MRI (T_2 -weighted fast spin echo multislice (FSEMS) sequence with a field of view of 30 mm x 30 mm x 0.8 mm, matrix resolution of 256² pixels, 15-30 slices, echo time of 10 ms, inversion time of 200 ms and repetition time of 3000 ms). Finally, tumor size was also measured with an electronic calliper (each measurement is an average of 2 to 3 independent users at each time point). On day +0, all mice received a radiotherapy treatment: 30 Gy in 15 min were delivered to the left side tumor using a Gamma Knife (Leksell Gamma Knife®, Elekta, Stockholm, Sweden). Mice were anaesthetized using isoflurane for the duration of the irradiation. One of the mice died from hypothermia – the measurements performed on this particular mouse before its death were included in the analysis.

We wanted to test whether radiation-induced inflammation had an effect on the probe accumulation. An anti-inflammatory treatment was applied to a second cohort of animals (n=6) that were monitored similarly as described above (QOS only) on days -2 and +15, with the particularity that all animals received a daily topical application of Spectro

EczemaCare cream containing 0.05% (w/w) clobetasone butyrate on control and irradiated tumors. Statistical difference was evaluated using a one-tailed t-test with Welch's correction based on the hypothesis that the anti-inflammatory treatment will reduce the fluorescence signal.

Image analysis and Volume Calculations

Images were analyzed using a set of Matlab functions developed in-house. For MRI images, the tumors clearly stood out when compared with underlying tissues, which allowed an experienced user to draw ROIs on each image. ROIs were stacked and summed up to determine the total tumor volume, considering the thickness of each slice. For OI, large regions of interest (ROI_{zone}) were drawn using white light and fluorescence images (Figure 1).

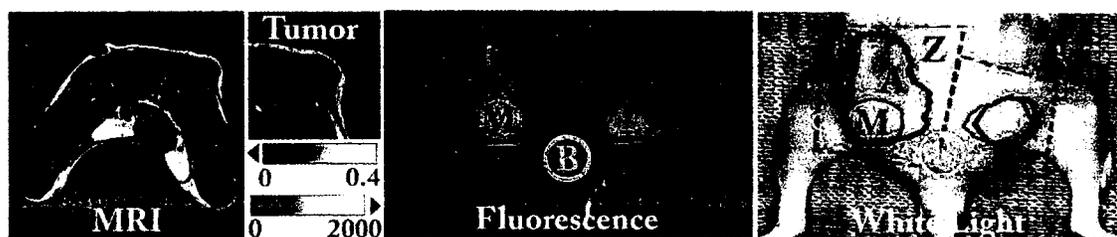


Figure 1. Tumor MRI and OI. In MRI (left), T_2 -weighted images provided sufficient contrast between tumor and underlying tissues to manually draw an ROI (green) on the tumors themselves and to exclude skin and fat. In OI, ROI selection was performed using fluorescence (middle) and white light (right) images (example from a mouse at day +15, 24 hours post QEPR-1.8 injection). A first ROI is drawn by the user (ROI_{zone} , Z) to roughly delineate the region of tumors and segregate other sources of fluorescence, such as the neighbouring tumor. A circular region (B) is drawn between the tumors at a position which includes only background fluorescence. The algorithm automatically selects a ROI consisting of pixels above the background and inside Z, which yields the ROI_{auto} (A). For comparison, tumors were traced manually by 5 users with experience with subcutaneous tumor models. The regions included by 3/5 of the users were kept to yield ROI_{man} (M). In this instance, region A (red) fits region M (green) properly for the non irradiated (right) tumors. Intensity scales are displayed in arbitrary units.

These ROI_{zone} allowed the user to separate the left and right side of the animals, and to exclude regions of high fluorescence which corresponded to non specific signal (gastrointestinal tractus). They were drawn to be large enough to include the tumor and all the surrounding areas. A circular background region was manually drawn between the tumors when enough space was available – else, this region was drawn in the middle of the back, above or below the tumors. This region was selected based on the overall fluorescence of the animal as to be representative of the normal fluorescence detected over the skin in non tumor regions. The algorithm then automatically computed the signal from the background (B_{Raw}) and the associated noise (ΔB_{Raw}). Pixels with fluorescence above $B_{Raw} + 4\Delta B_{Raw}$ inside a ROI_{zone} were selected as ROI_{auto} . In order to assess if the algorithm performed correctly, five individuals with experience with this particular tumor model were asked to trace a manual ROI (ROI_M) over the tumors using only the white light image. The ROI_M corresponds to a region which was selected by at least three out of five users.

The ROI_{auto} , which should normally consist of the tumors, were used to perform the analysis presented in Figure 4 and 5. The average signal (S_{Raw}), total signal (ΣS_{Raw}) and number of pixels (n) were calculated. These three parameters are related with the following equation:

$$S_{Raw} = \frac{\Sigma S_{Raw}}{n} \quad [1]$$

In order to correct S and ΣS for signal variation between imaging sessions, these parameters were corrected using the following equations:

$$S = \frac{[S_{Raw} - B_{Raw}] \bar{B}}{B_{Raw}}, \quad [2a]$$

$$\Sigma S = S * n, \quad [2b]$$

where \bar{B} is the average background of all imaging sessions. The number of pixels was converted to surface (σ) using the image resolution (84.132 Pixel/mm²). For fluorescence volume measurements based on σ , (V_σ) we assumed that tumors are hemispheres with a flat surface corresponding to the ROI_{auto}, which allowed us to use the following equations:

$$r = [\sigma/(\pi)]^{1/2}, \quad [4a]$$

$$V_\sigma = 4\pi r^3/6. \quad [4b]$$

For calliper measurements, the ellipsoidal formula equation from (Tomayko et Reynolds, 1989; Jensen *et al.*, 2008) was used:

$$V_{\text{calliper}} = L \times W^2 / 2 \quad [5]$$

where L and W are the length (longest dimension) and width of the tumor ($\pi \approx 3$), respectively.

Results

QEPR-1.8 pharmacokinetics and biodistribution

A first cohort of 3 Balb/c mice was injected with 1 nmole of QEPR-1.8, and fluorescence was monitored for 48 hours. The pharmacokinetics of the probe is presented in Figure 2. As expected, the initial distribution of the probe is homogenous, and no tumor/background ratio (contrast) is observed during the first 10 minutes. After 30 minutes, a slow but steady increase of the contrast is noted as QEPR-1.8 is flushed from most tissues, and eliminated from the bloodstream. The contrast is maximal 7 hours after injection and remains roughly stable for 48 hours.

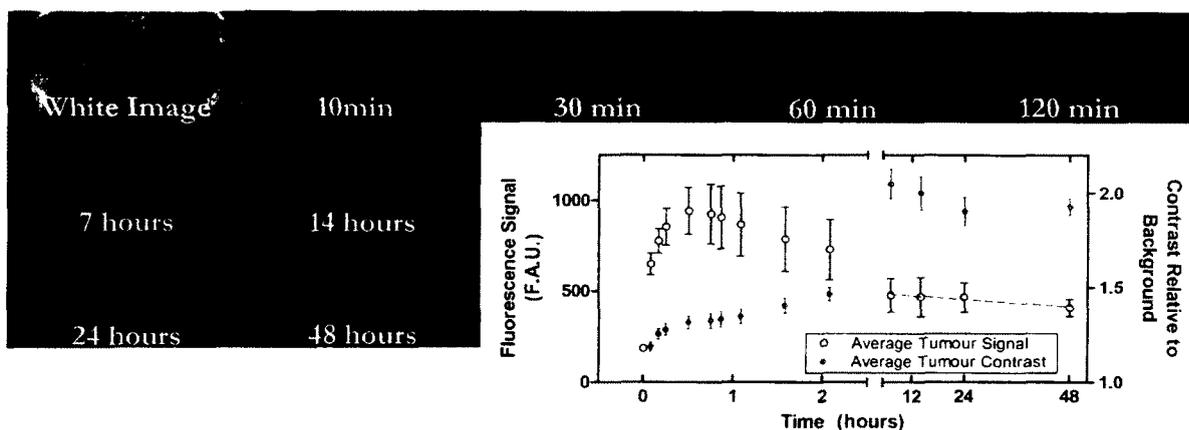


Figure 2. Injection of QEPR-1.8, fluorescence imaging and pharmacokinetics. Initially (0-30 minutes), fluorescence is roughly homogenous, indicating that QEPR-1.8 flows inside the vasculature with no visible preference. Tumor to background ratio increases and reaches a peak after 7 hours. The contrast remains roughly stable for 48 hours afterwards.

Fluorescent signal was found in the intestine and stomach of both QEPR injected and non-injected mice revealing that the content of these organs display spontaneous autofluorescence in accordance with the study by Inoue *et al.* (Inoue *et al.*, 2008) demonstrating that regular rodent diet contains large amounts of alfalfa and therefore

chlorophyll and related metabolites (that generate signal with a peak wavelength at 680 nm). Mice injected with QEPR-1.8 presented fluorescent signal in tumors and kidneys indicating that the probe accumulated in the tumors and was eliminated through the renal pathway.

Based on these results, we decided to perform the following tumor fluorescence measurements 24 hours post injection, at which time a high contrast was still present. We also hypothesized that the spontaneous endogenous fluorescence signal of tissue was relatively stable over time, and did not significantly affect our measurement. As discussed above, signal from the flank of the animals, corresponding to the intestines was sometimes present but was excluded from our analysis using manual tracing (Z regions, Figure 1).

Tumor Growth Monitoring

To assess the possibility of monitoring tumor growth and response to radiotherapy, we monitored the fluorescence of tumors 24 hours after injection of QEPR-1.8 and over a three weeks period (Figure 3). As expected, the control (non irradiated) tumor fluorescence intensity increased over 21 days (Figure 3C), reflecting tumor growth as measured by MRI. However, the signal of irradiated tumors was different: it initially increased from day -6 to day +2, and remained stable between day +2 and +6, but quickly increased afterwards. This tremendous fluorescence signal increase did not reflect the size of the irradiated tumors as measured by calliper or MRI (Figure 3). It also corresponds to a divergence between ROI_M and ROI_A (Figure 1), as signal detected outside the tumors was automatically selected by the algorithm. In parallel to this fluorescent increase in irradiated tumors regions, we observed that the irradiated skin surrounding the tumors became strongly fluorescent after

the injection of QEPR-1.8. Inflammation and dermatitis were also visible on the irradiated region beginning on day +10, but became obvious on day +15, suggesting that inflammation modified the EPR effect.

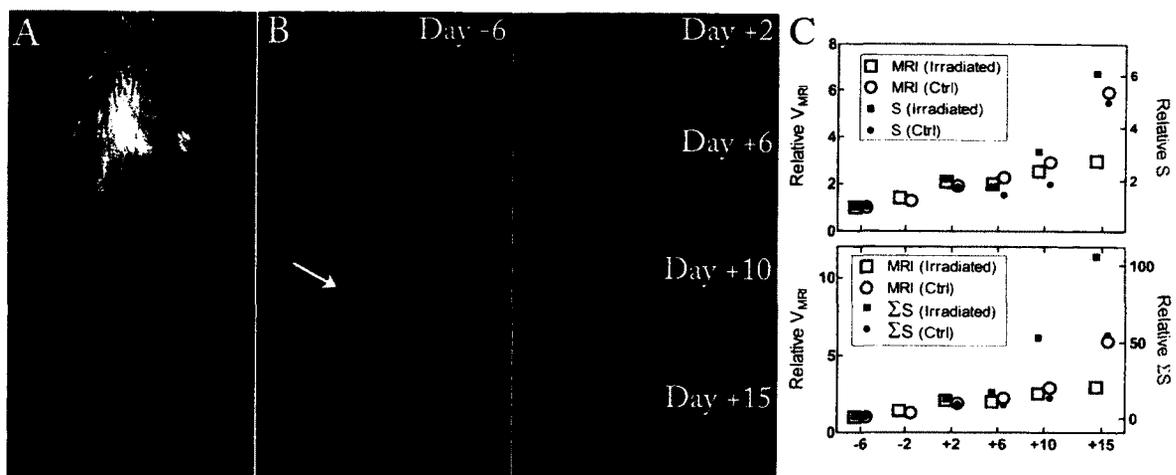


Figure 3. Tumor follow-up before and after radiotherapy with optical imaging and MRI. **The left tumor was irradiated at day 0.** (A) White light image at day -6 and (B) fluorescence images acquired from day -6 to day +15. The signal of both tumor increases over time, but skin regions surrounding the irradiated tumor show increased QEPR-1.8 uptake (black arrow). Remote fluorescence signal from kidneys or intestines (white arrow) were not considered in the analysis. (C) Relative V_{MRI} , fluorescence average signal (S) and total signal (ΣS) as a function of time. While the control (right) tumors V_{MRI} (black circles) increases from day +2 to day +15, the growth of the irradiated tumor (black squares) is slowed between day +2 and +10. S and ΣS measurements of control tumors reflect the V_{MRI} increase (gray dots vs black circles). On the other hand, a large fluorescence increase is noted for the irradiated tumors despite the volume stabilization as noticed by MRI (gray squares vs black boxes). All values are reported as fold increase of volume or signal relative to day -6. The scales have been adjusted so that points from day -6 and +2 roughly superimpose for both control and irradiated tumors - the divergence of fluorescence vs V_{MRI} for the irradiated tumors is thus more clearly observed.

Fluorescence Quantification and Correlation to V_{MRI}

In order to account for and to better understand the impact of the uptake of QEPR-1.8 around the irradiated tumors, data were analyzed either including or excluding the data

points of irradiated tumors. While lesions around tumors were visible from day +10, a one week margin of safety was added to ensure the removal of all data points potentially polluted by this non tumor signal. Hence, the exclusion group (referred to as PPD, Potentially Polluted Data) consisted of fluorescence measurements of irradiated tumors from day +6 to day +15. Three parameters characterizing tumor fluorescence were quantified, all as a function of time: the average signal over the tumor area (S), the surface covered by signal above the selection threshold (σ), and the product of these two quantities, corresponding to the summation of all selected pixels in the tumor area (ΣS) (Figure 4).

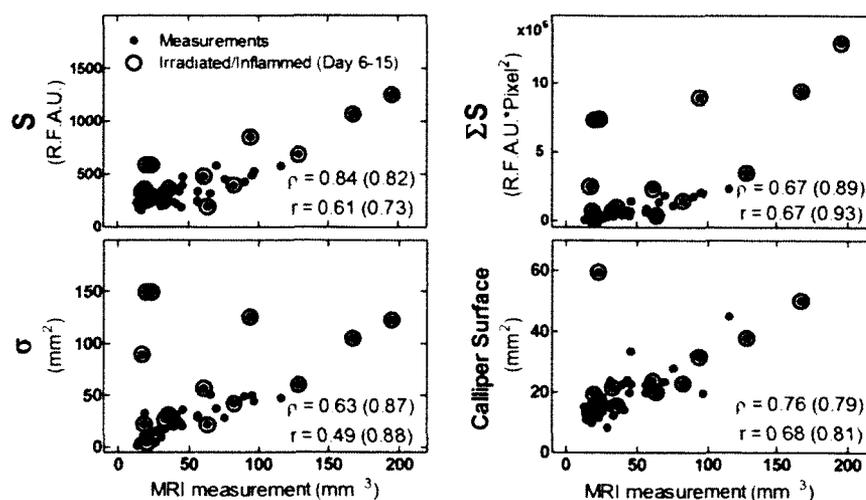


Figure 4. Comparison of MRI volume measurement, fluorescence measurement and calliper measurements. Three parameters of the tumor fluorescence images were considered: The average signal S (top), the signal surface σ (middle), and the summation of the signal over the surface, ΣS (bottom). Data points corresponding to tumors with potentially inflamed surrounding tissues due to irradiation (PPD) are circled dots (irradiated tumors from day +6 to +15). Pearson's (r) and Spearman's (ρ) correlation coefficients are reported for each parameter and either include or (exclude) data points that are potentially affected by skin inflammation.

The values of these 3 parameters as a function of MRI measurements are displayed in Figure 4. We observed that when the PPD are included, a poor correlation between OI and MRI was detected ($r < 0.70$). This was attributed to the important uptake of QEPR-1.8 in tissues surrounding irradiated tumors (as shown in Figure 3 - Day +15, black arrow) resulting in an overestimation of tumor volume by OI and low correlation coefficients. This QEPR-1.8 uptake in non tumoral tissue of irradiated mice can also explain that while the average signal is not much affected by the PPD, the total surface is overestimated (larger data spread). Excluding the PPD yielded much better correlation coefficients, going from average ($0.70 < r < 0.80$) to good ($0.80 < r < 0.90$) and even excellent ($r > 0.90$) in one measurement. The summation of the signal over the surface (ΣS) provided the best correlation to MRI measured volumes, followed by the total surface (σ).

Calculation of volumes using fluorescence

We investigated whether fluorescence measurements could provide tumor volumes. Hence, the relationship between V_{MRI} , $V_{calliper}$ and the fluorescence parameters were further characterized. Figure 5A shows the linear fit performed on the ΣS measurements excluding the PPD. The abscissa at $\Sigma S = 0$ ($V_{MRI} = 12.7 \text{ mm}^3$) yields an estimate of the smallest volume of tumor detectable by OI in our conditions. While the linear fit provides a satisfying linear relation between ΣS and V_{MRI} , this relation is condition specific and is likely to change in other tumor models (i.e. orthotopic xenograft). In an attempt to overcome this limitation, we also used the surface measurements to estimate a volume (V_{σ}). We approximated all tumors to hemispheres for which the surface σ is the base. Calculating the radius r using Eqs 4a and b, and then computing the volume of a

hemisphere yielded an estimate of the volume in Figure 5B (V_{σ}). After removing a single outlier data point from our analysis, we obtained a satisfactory relationship between V_{MRI} and V_{σ} . Once again, a minimal tumor volume was found here (12.7 mm^3), which is identical to that found with ΣS . The relation underestimates the real volume for small tumors, and overestimates large tumors, with reduced error ($<15\%$) on tumors between 31 mm^3 and 63 mm^3 . We compared calliper measurements ($V_{Calliper}$ calculated from Eq. 3) with V_{MRI} in Figure 5C. The linear relation between $V_{Calliper}$ and V_{MRI} was found to be parallel to the expected values (slope = 1.001), but a constant difference of 14 mm^3 was found, which can be interpreted as a systematic error corresponding to an overestimation of 14 mm^3 for all tumor size. Hence, the relative error on $V_{calliper}$ decreases from 100 % (for 14 mm^3 tumors) to 15% (for 94 mm^3), and to 10% (for 140 mm^3). The intersection of the relative errors on $V_{calliper}$ and V_{σ} is located at 73 mm^3 , with values $<73 \text{ mm}^3$ being more precisely estimated by V_{σ} .

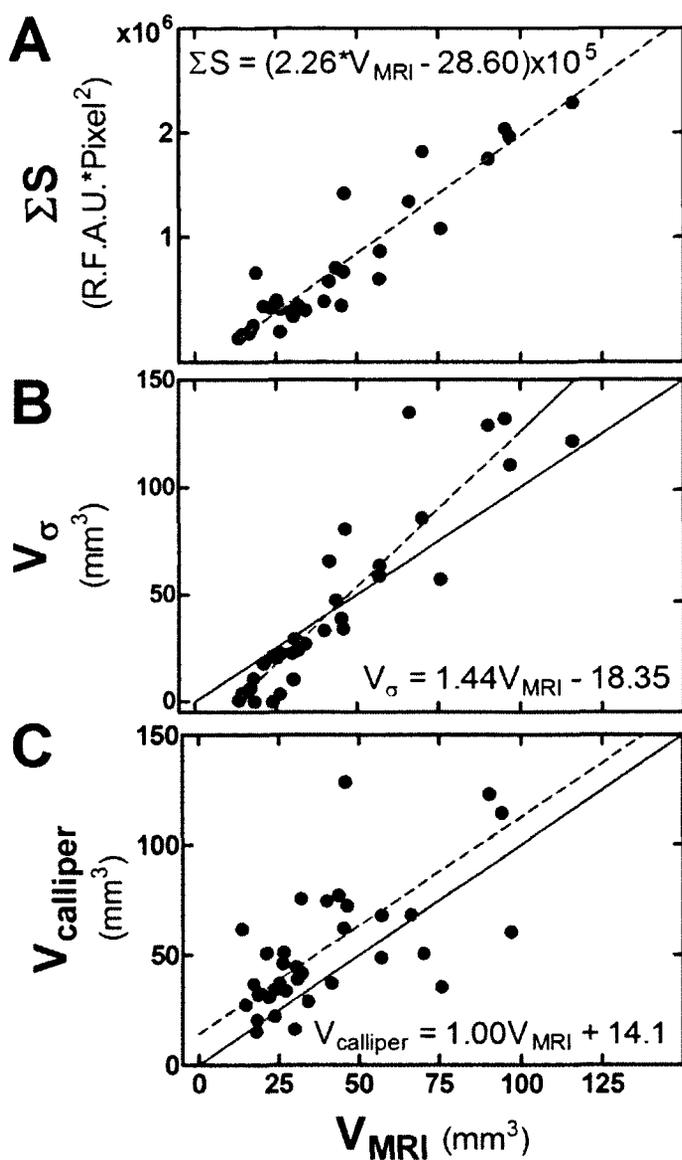


Figure 5. Correlation between $V_{calliper}$, V_{σ} , and ΣS with V_{MRI} . (A) The $V_{MRI}/\Sigma S$ was found to be highly linear, but because it cannot be directly translated to a volume, it is difficult to assess the accuracy of this relation. (B) V_{σ} was calculated for a hemisphere with a flat surface σ . The linear fit (dashed line) can be compared against the expected size (full line) to show that only average tumors are likely to be adequately measured. (C) $V_{calliper}$ was calculated using equation 5. The linear fit (dashed line) is almost parallel to the expected size (full line), indicating the absence of size-related error.

Impact of an anti-inflammatory treatment on QEPR-1.8 uptake in irradiated skin regions

In order to assess whether the increased signal around irradiated tumors can be attributed to inflammation, an anti-inflammatory treatment was tested on an additional cohort of animals ($n = 6$). The results are presented in Figure 6. The tumor itself was either included (left groups) or excluded (right groups) for both surface σ (Figure 6A) and signal sum ΣS (Figure 6B) analysis. The treatment reduced the importance of the inflammation related signal by as much as 40%, and this was found to be significant ($p = 0.026$) while including the tumor. The impact on the σ was smaller (20%), and was found to be significant while including the tumors ($p=0.035$).

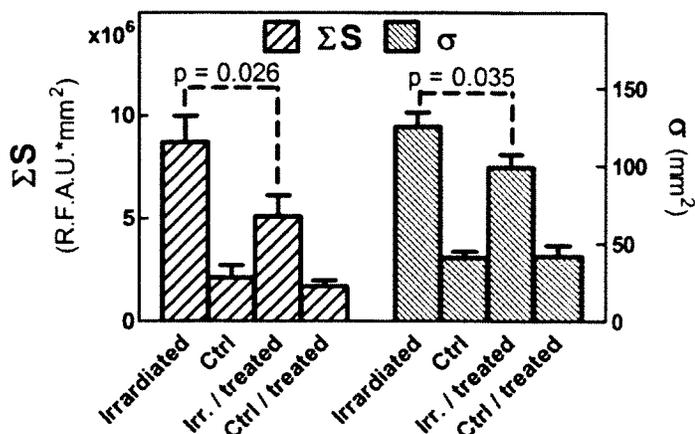


Figure 6. The effect of an anti-inflammatory treatment on the uptake of QEPR-1.8 in the irradiated regions. ΣS and σ Data are presented as mean + SEM, and p values were determined using one-tailed t-test with Welch's correction.

Discussion

The EPR effect is commonly exploited to target cancer tissues since large molecules preferentially enter tumor tissues through a leaky vasculature, and are restrained from leaving because of their deficient lymphatic network. Optical probes were recently designed for *in vivo* cancer imaging using fluorescent macromolecules such as lactosome-ICG (Makino *et al.*, 2009), Cy5.5 labeled nanoprobe (Sandanaraj *et al.*, 2010) and a far-red indocyanine-based fluorophore noncovalently binding to albumin (Montet *et al.*, 2006). EPR was also used as a tool to optimize antitumoral drug effect. In fact, Yu *et al.*, demonstrated that camptothecine was more efficient when conjugated to a PEG (poly(ethylene glycol)) moiety, showing that EPR enhances the tumor uptake, hence the anticancerous activity of the drug (Yu *et al.*, 2005). In our study, QEPR-1.8, an unspecific fluorescent probe composed of a near-infrared fluorophore conjugated to a PEG, provides visual contrast between tumor and tissues. After 2 hours, the tumors are clearly visible (Figure 2, 120 min) while the probe is flushed from other tissues. QEPR-1.8 was designed to accumulate in tumor through EPR effect, and is not expected to bind any cellular or extracellular target – its accumulation in tumors is only related to its size. However, unspecific interactions may not be completely ruled out.

While the lack of lymphatic drainage and the anarchic vasculature of tumors are known to cause the accumulation of compounds at the tumor site, other pathological phenomenon were described to cause EPR, including inflammation (Ishihara *et al.*, 2010; Sandanaraj *et al.*, 2010). Tissue damage and inflammation are common unwanted side-effects to radiation therapy (Moriyasu *et al.*, 2007) and radiation was already described to enhance

the EPR effect of tumors (Cohen *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2000). In our study, a strong signal was observed around the irradiated tumor from day +10 to day +15. The irradiation of the tumors with a gamma knife was focused on the tumors and the dose deposition pattern was quasi-spherical with a diameter of 14 mm, which is greater than the average tumor diameter of 5.4 ± 1.4 mm (average and SD of calliper measurements of day -2 and +2, $n=11$). This is similar to the clinical situation where a margin around the tumor is often irradiated to account for possible infiltration of tumor cells into otherwise healthy tissues. Skin lesion, dryness and redness attributed to radiation-induced dermatitis were clearly visible on irradiated mice. Taken together, these observations suggest that inflammation facilitated the tissue entry of QEPR-1.8. This hypothesis was confirmed by the reduction of QEPR-1.8 uptake after the administration of an anti-inflammatory treatment. Because of inflammation, we had to remove several data points (PPD) to assess the possibility of performing volume measurements using OI data.

We quantified tumor fluorescence using three parameters: the average signal S , the total surface σ and summation of signal over the surface ΣS . The average signal S yielded relatively poor correlation with V_{MRI} ($\rho = 0.82$ and $r = 0.73$). If one were to approximate the tumor as a 3D volume containing a roughly homogenous concentration of probe, the average signal measured in a portion of one surface (i.e. a single pixel) would reflect the amount of probe underneath this region and emission of this amount of probe will be affected by absorption and scattering. Thus the average signal can be considered proportional to the average tumor thickness, but this relationship will not be linear as the

signal is reduced when depth increases. This absence of linearity is responsible to the poor correlation between S and V_{MRI} .

We then considered a second parameter: the surface (σ). Our results indicate that the relation between σ and V_{MRI} is more accurate than with S . Yet, it still consists of two-dimensional information – one dimension short of a volume measurement. In fact, thickness cannot be monitored accurately using the surface alone unless approximating an isometric tumor growth (e.g.: a hemisphere), or performing advanced image treatment to use an ellipsoid volume. This is also one of the limitations of using the calliper method: without a means to assess efficiently the full thickness of a tumor, one can only approximate the thickness, hence the real volume.

The third parameter, the summation of the signal (ΣS) will account both for the surface and the average signal, yielding a satisfactory correlation between MRI volume/ ΣS ($\rho = 0.89$ and $r = 0.93$). Still, the use of this parameter suffers from two drawbacks. First, while both the surface and signal are considered, the thickness is still inaccurately approximated. Second, there is no way to directly calculate a volume from ΣS , and one must rely on pre-established volume/ ΣS relation in order to perform an absolute volume monitoring. According to these observations, we decided to approximate 3D volumes from fluorescence surface data by approximating tumors as hemispheres with radius r , which was calculated from σ . The linear fit performed for the $V_{\sigma}/V_{\text{MRI}}$ relation (Figure 5) shows that this method has a limited range of usefulness, and is likely to underestimate the volume of small

tumors, but will overestimate that of large tumors. This behaviour of the relation can be explained by using known characteristics of light propagation inside tissues. The signal from small tumors will be absorbed before exiting the surface, thus preventing the observer (or algorithm in our case) from properly delimitating the tumor region. In other words, tumor fluorescence will be too low to be detected. On the other hand, a portion of the photons emitted from large tumors will be scattered outside the tumor itself, and will exit from the periphery, increasing the perceived tumor size. The range of volumes that can be properly measured (i.e. 31 mm^3 and 63 mm^3) corresponds to the intersection of these two effects. Fortunately, this range of subcutaneous tumor volumes is frequently encountered in preclinical studies.

Our results with the calliper method show that while this method is not sensitive to irradiation (highest r and ρ coefficient when including the PPD), it has a greater data spread than that of ΣS and σ measurements (compare r and ρ for these three groups when excluding the PPD). In our model, the calliper method was found to overestimate tumor volume by 14 mm^3 independently of tumor size. The inclusion of the skin during the measurement could explain part of this deviation. This error relative to tumor size is important for small tumors, but decreases as tumor volume increases, allowing us to conclude that, in our conditions, the σ method is more precise than the calliper method for tumors below 73 mm^3 . It must be noted that this conclusion is model specific since many factors will impact the fluorescence of a tumor (*e.g.* certain tumors with a higher blood fraction will have a larger absorption cross section whereas tumors with lower blood fraction may have a larger diffusion cross section, affecting the signal that will be detected for tumors of identical size). Hence, while our method could be used with other tumor

models, it is not the case for the values of the relations established here between volume and fluorescence.

To assess if the inflammation induced by the irradiation was responsible for the signal increase observed past day +6 in our model, we performed an anti-inflammatory treatment on an additional mice cohort. The results presented in Figure 6 indicate that the treatment had a significant effect on both ΣS and σ of irradiated tumors; confirming our hypothesis. We observed that ΣS was more affected by the anti-inflammatory treatment than σ , once more pointing toward ΣS as a more sensitive parameter. A small non significant shift was observed between control tumors. It is known that tumors are sites of inflammation. Thus, it is possible that our treatment also reduced the accumulation of QEPR-1.8 in control tumors, but much less efficiently. This effect was not detected on σ . This could be explained once more by the fact that most tumor pixels have a very high signal, and the treatment could not bring these pixels below the detection threshold and failed to remove them from the ROI_{auto} (S is slightly decreased, but not σ).

One could propose that the average signal (S) should be proportionnal to the inflammation in regions surrounding the tumors, and that it should be expected to decrease after an anti-inflammatory treatment. Analysing the values of S in a similar way as presented in Figure 6 did not reveal any significant difference between the cohorts. While at first surprising, it is important to remember that our method for ROI selection is based on the signal intensity of pixels. By using an anti-inflammatory treatment, the signal intensity of certain pixels is reduced below the selection threshold and no longer contributes to the average. This will reduce the surface σ and the total intensity ΣS , but will have little effect on S when using

our selection method. Alternative analysis methods would entail manually selecting the regions surrounding the tumors, a method prone to user-induced bias, or other semi-automatic pixel selection methods. While the former would not be convenient, the latter is beyond the scope of this work.

The development of novel fluorescent probes is receiving unprecedented attention. Many of these probes are entailed with a high affinity for a specific target (e.g., receptor or membrane protein). In some cases, binding results into activation of the probe (e.g., the FRET mechanism), which further increases the target/non target signal ratio. However, delivery of the probe to the target remains a crucial consideration in probe development. Delivery is thus a determinant factor in the efficiency of a probe. Further, any change in delivery during a longitudinal study will confound data analysis. In the present study, the uptake of QEPR-1.8 through the EPR effect was observed to be modulated by irradiation. As a result, the tumor volume determined from optical imaging differed from that determined by MRI. This highlights the need for appropriate control experiments in the longitudinal assessment of tumor characteristics. Controlling for perfusion may help in assessing the level of unspecific accumulation of the probe at the target site. Perfect knowledge of delivery parameters may however still be insufficient since the concentration of probe does not necessarily scale linearly with binding efficiency. For example, doubling the concentration of substrate does not necessarily double the rate of catalysis by a targeted enzyme, such that quantification would remain challenging.

Conclusion

We used the fluorescent probe QEPR-1.8 to monitor tumor growth in a preclinical model of radiation therapy. While tumor volumes measured by MRI were correlated with the fluorescence, this correlation was perturbed by the uptake of QEPR-1.8 in regions surrounding the irradiated tumors. This uptake was reduced when the animals were treated with a corticoid-based topical treatment, confirming the role of inflammation in these regions. Fluorescence OI coupled to an algorithm-based ROI selection resulted in an improvement over the standard calliper measurement for small tumors when using the surface σ , and an even greater accuracy with ΣS when a calibration is performed. Additionally, our results indicate that OI with EPR targeting fluorescent probes has potential in the evaluation of treatments impacting tumor growth or displaying anti-inflammatory properties. Finally, our results provide an important clue for the development of molecular probes and the selection of animal models to test their specificity. In addition to specificity, probe delivery and distribution should be taken into account in the full characterization of imaging probes.

Chapitre 6. Discussion

Depuis le début de la dernière décennie, plus d'une vingtaine de groupes de recherche ont développé des molécules leur permettant de cibler et de quantifier une ou plusieurs MMPs *in vivo*. Bien que plusieurs d'entre eux suggèrent que leur molécule est parfaitement fonctionnelle, leurs conclusions sont mitigées par l'absence de certains contrôles.

De notre côté, nous sommes parvenus à obtenir une molécule avec commutateur de solubilité permettant de différencier entre deux tumeurs possédant des niveaux de production de MMP-2 différents, mais l'évaluation de nos sondes optiques s'est révélée décevante – entre autre à la suite de contrôles de captation non spécifique. Un contrôle de captation approprié est le principal élément manquant dans les articles de la littérature présentant une molécule « fonctionnelle ».

Il est donc primordial de bien comprendre les contrôles que nous utilisons et leurs limitations. Cette discussion s'orientera initialement sur les contrôles utilisés par nous et dans la littérature. Ensuite, nous aborderons certains éléments expérimentaux qui pourraient permettre de développer des sondes optiques plus optimales et de les tester efficacement et sans équivoque.

6.1 Les contrôles en imagerie

6.1.1 Contrôle de la captation non spécifique avec une molécule inerte mais non apparentée

Une molécule ou un ion inerte (ou presque inerte) peut être utilisé afin d'évaluer la perfusion et la perméabilité (captation ou extraction) des tissus (Su *et al.*, 2005; Lancelot *et al.*, 2008). Nous avons-nous-même employé ce type de contrôle (Gd-DTPA) dans le premier manuscrit présenté, mais en parallèle avec un deuxième contrôle nous semblant plus approprié (PCA2-scrambled avec séquence brouillée). Il est important de noter que la nature (volume hydrodynamique, charge et polarité de surface) d'une molécule affecte le taux auquel elle peut s'accumuler puis être éliminée d'un tissu. En fait, il a même été montré que le volume disponible à l'intérieur d'un tissu dépend de la taille de la molécule utilisée pour le sonder (Esposito *et al.*, 1979). Ainsi, un tel contrôle fournit une approximation de premier ordre de la captation non spécifique, mais n'est pas suffisant

pour normaliser le signal d'une molécule sonde différente, entre autre en raison de la non correspondance de leur pharmacocinétique, elle-même entraînée par les différences hydrodynamiques et de polarité entre les molécules.

6.1.2 Contrôle de la perfusion avec une molécule inerte et apparentée

Ce type de contrôle comprend principalement trois types de molécules :

- a) Les sondes peptidiques contrôles de type brouillées (mêmes acides aminés que la molécule sonde test, mais avec un ordre différent afin d'annuler sa spécificité)
- b) Les sondes contrôles isomériques (constituants dans le même ordre, mais avec des angles de liaison chimique inversés par rapport à la sonde test). L'exemple classique est l'emploi d'acides aminés D dans un peptide, que les enzymes clivent difficilement ou qui ne peuvent pas lier leur cible.
- c) Les sondes contrôles pré-activées.

Les contrôles brouillées et isomériques sont très répandus dans la littérature (Bremer *et al.*, 2001; Lepage *et al.*, 2007), ce qui justifie le choix des contrôles brouillés (manuscrits 1 et 2) et isomériques (manuscrit 2) dans nos travaux. Il est à noter que des modifications, même mineures, peuvent induire des modifications importantes de leur comportement. En vertu des résultats obtenus *in vivo* avec le composé *Is*, qui est activé malgré sa séquence brouillée (Fig. 37), il est maintenant clair qu'une confirmation solide de la non-activation de la molécule doit être effectuée, *ex vivo* et *in vivo*, et pas seulement avec les enzymes ciblées, mais avec des systèmes plus complexes comme des extraits de tissus et du plasma – or, ces tests sont rarement effectués dans le domaine de l'imagerie des MMPs.

Il est important de noter que l'utilisation d'un isomère D n'assure pas que la molécule sera parfaitement stable, ou qu'elle ne produira pas de signal *in vivo* dans le cas d'une sonde optique avec groupement atténuateur. Nos résultats avec les sondes Cy5/QSY21 nous ont appris que la fluorescence peut aussi être affectée par les phénomènes de dimérisation, et que le bris de ces interactions mène à l'augmentation de leur signal de manière non spécifique. De plus, il a été montré dans la littérature que les séquences en acides aminés D peuvent être clivées (du moins au niveau des sites achiraux comme les glycines) (Olson *et*

al., 2009). Il s'agit toutefois du meilleur contrôle d'activation disponible – pour autant qu'un tel contrôle puisse être utile. Dans notre cas, le signal des molécules *II*d et *III*d était très faible, ce qui nous a mené à plutôt utiliser un autre contrôle (*V*) pour effectuer la normalisation de nos résultats.

Un contrôle avec une sonde pré-activée (ou toujours activée) permet de mieux sonder la distribution de la sonde test. Ceci implique toutefois que la distribution initiale de la sonde pré-activée diffèrera légèrement de la sonde test – en cela qu'il lui manquera un fragment pouvant influencer sa pharmacocinétique. Dans notre cas, *V* diffère de *I* par l'absence de la portion QSY21. Or, nous avons démontré que les propriétés de dimérisation de la sonde *I* reposent sur ce groupement. Ceci implique que le volume de la sonde *I* avant son activation peut-être fort supérieur (deux fois ou plus) à celui de la sonde *I* activée (*V*). De plus, le groupement QSY21 a des attributs hydrophobes. Ainsi, les pharmacocinétiques de *I* et de *V* seront différentes avant l'activation de la sonde, mais identiques par la suite, ce qui en fait un contrôle intéressant. Bien sûr, *V* est un contrôle pour *I*, mais des contrôles correspondant à *II* et *III* n'ont pas été préparés en raison de l'absence de différence de signal aux tumeurs avec ces deux composés.

Il est à noter que dans tous les cas, un contrôle de perfusion nous permettrait d'identifier un signal faux positif (la sonde s'accumule dans un tissu, mais peu de cible s'y trouve), mais l'identification d'un signal faux négatif (la sonde test n'entre pas dans un tissu, mais le tissu contient une quantité normalement détectable de la cible) serait nécessairement plus difficile à déceler.

6.1.3 Contrôle de compétition ou d'inhibition

Ce type de contrôle consiste à injecter une molécule non détectable dans le sujet qui peut avoir l'un ou les deux effets suivants :

- a) Occuper les sites de liaison de la sonde test, empêchant sa rétention au niveau de la cible.
- b) Inhiber l'activité d'une enzyme cible, prévenant l'activation de la sonde test. Cette inhibition peut être compétitive ou non compétitive.

L'exemple classique de ce genre de contrôle est l'utilisation d'un ligand froid, c'est-à-dire de comparer un radiotracteur avec un précurseur non radiomarqué (Wagner *et al.*, 2007). Il est important de noter que les contrôles compétitifs confirment que les deux molécules (sonde et contrôle) lient les mêmes molécules. Cela permet de confirmer les sources de signal saturables (p. ex. sites de récepteur ou d'enzyme), mais non les sources de signal non ou peu saturable (p. ex. augmentation de la perfusion ou de la perméabilité, affinité pour les membranes cellulaires, pénétration cellulaire non liée à un ciblage spécifique.). Les molécules cibles restent inconnues et doivent être confirmées indépendamment. Cette limitation peut sembler anodine, mais dans le cadre de l'imagerie des MMPs, il ne faut pas oublier que la plupart des molécules sont sélectionnées pour leur affinité *in vitro*, par exemple en criblant des bibliothèques de peptides (Medina *et al.*, 2005). Ceci signifie qu'après une identification basée sur l'affinité pour la cible, la spécificité de la molécule est évaluée contre un nombre restreint d'autres cibles et que le reste du protéome est complètement négligé (~25 000 gènes, codant pour une ou plusieurs protéines différentes). La même limitation s'applique aux contrôles décrits dans la section précédente – un contrôle brouillé ou isomérique incapable de lier ou d'interagir avec la cible peut trouver un partenaire dans le reste du protéome. Cette absence de spécificité pourrait facilement expliquer les échecs avec les inhibiteurs radiomarqués (Furumoto *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2003; Oltenfreiter *et al.*, 2006).

Il est à noter que dans certains articles portant sur l'imagerie des MMPs, la compétition avec un inhibiteur est amorcée plusieurs jours avant l'essai avec la sonde test (Lancelot *et al.*, 2008). Or, les MMPs régulent plusieurs phénomènes physiologiques dont l'angiogenèse : une compétition précoce peut potentiellement provoquer une variation de la captation non spécifique. Il est primordial d'effectuer en plus un contrôle de la captation afin de s'assurer que la compétition ou l'inhibition n'a pas modifié le système biologique ou encore effectuer l'injection de la molécule compétitive aussi tard que possible avant l'injection de la sonde test. Dans le cas de nos travaux, les contrôles avec inhibiteurs étaient prévus dans le cadre de notre démonstration. Toutefois, étant donné le manque de spécificité des sondes *in vivo*, ces contrôles seront effectués si une molécule spécifique est synthétisée.

6.1.4 Contrôle à l'aide d'une lignée cellulaire avec un niveau d'expression de la cible nul ou faible

Ce type de contrôle utilisé dans les modèles de xénogreffe tumorales consiste habituellement en l'utilisation de l'une des deux stratégies suivantes :

- a) Utilisation d'une lignée cellulaire identique mais dont la production de la cible est modifiée (KD ou KO (knockout))
- b) Utilisation d'une lignée cellulaire différente avec un niveau de production de la cible qui est faible ou nul

Il est primordial de considérer plusieurs points lorsque ce type de contrôle est utilisé. Tout d'abord, le rôle de la cible dans un modèle peut influencer les phénomènes non spécifiques. Par exemple, la MMP-2 influence l'angiogenèse. Son absence peut potentiellement réduire la captation non spécifique de la sonde – et donc induire exactement la baisse de signal attendue (faux négatif). C'est exactement ce qui est observé dans le cadre de nos essais avec *I*, *II* et *III* (Fig. 45). De plus, l'absence d'un mécanisme dans un tissu peut provoquer une compensation par les cellules stromales et les cellules immunitaires si ces dernières sont présentes. Dans le cas de la MMP-2, il a été démontré que les macrophages et les lymphocytes T peuvent produire cette enzyme, et donc compenser pour le phénotype KD de nos tumeurs MC7-L1. Par exemple, malgré le fait que nos cellules MC7-L1 MMP-2 KD produisent très peu de MMP-2 comparativement aux cellules WT, la comparaison des tumeurs KD et WT indique que la différence entre leur production de MMP-2 n'est que d'environ 50% (Chapitre 3, Fig. 2 et section résultat du manuscrit). Un autre exemple particulièrement frappant de l'importance de ces contrôles est l'emploi de la lignée A549 comme contrôle positif et comme contrôle négatif dans des articles différents. Oltenfreiter *et al.* (2006) ont évalué que comparativement à plusieurs autres lignées de cellules, le niveau d'expression des MMP-2 et -9 des A549 est limitée *in vitro*. Toutefois, les zymographies effectuées sur des extraits de tumeurs ont montré qu'une quantité importante de MMP-2 active est présente, et leur groupe de recherche a donc utilisé cette lignée pour évaluer un radiotracer. Toutefois, un autre groupe n'ayant pas effectué de contrôle sur des

extraits de tumeurs ont utilisé les A549 comme lignée n'exprimant pas la MMP-2 (Wang *et al.*, 2009).

En résumé, un contrôle *ex vivo* de la présence de la cible dans le modèle est essentiel pour confirmer la différence entre deux lignées cellulaires *in vivo*, et puisque l'impact de l'absence ou de la présence de la cible peut être important, un contrôle de captation reste nécessaire.

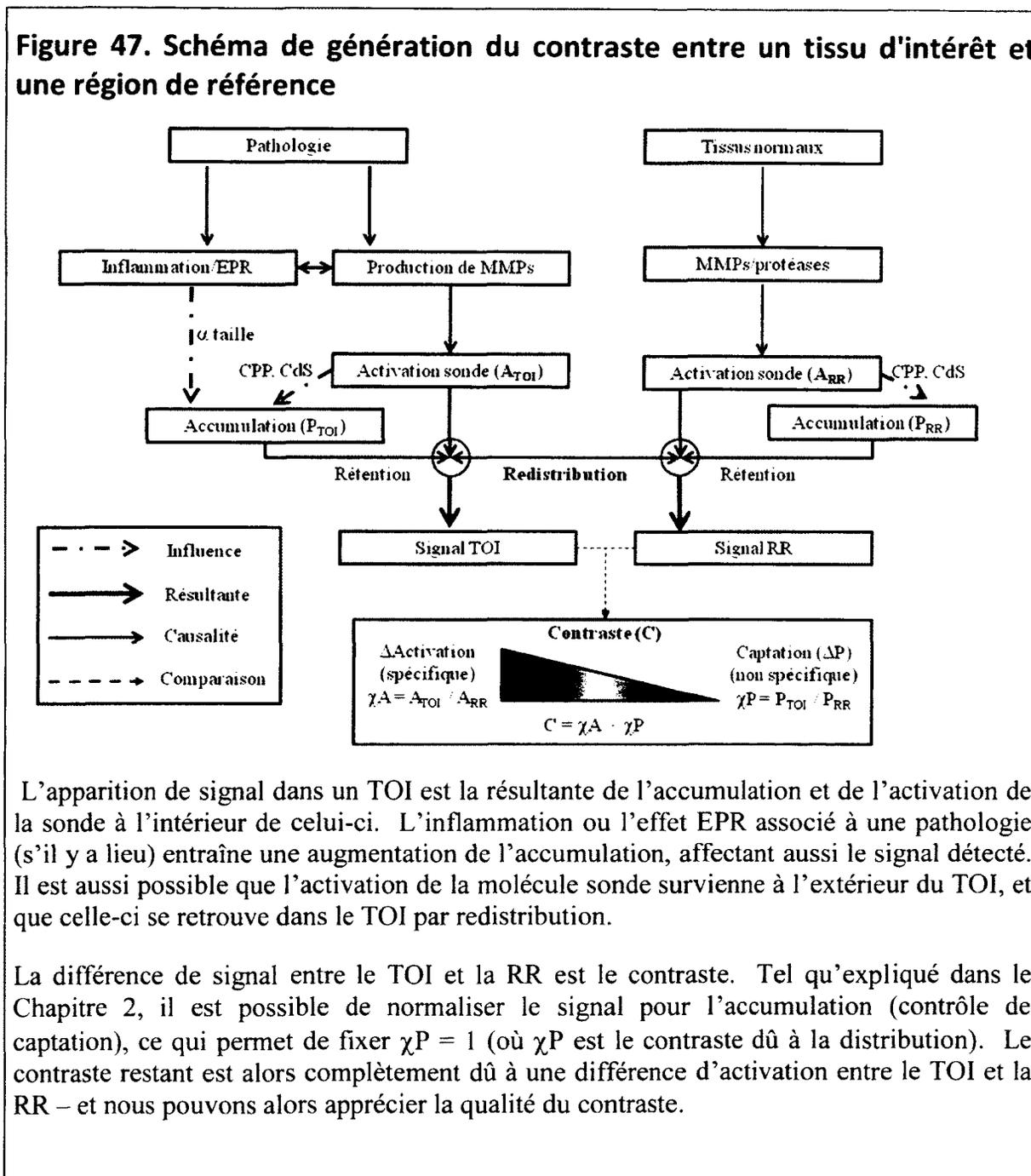
6.1.5 Évaluation de sonde dans des modèles de pathologie *in vivo* et comparaison avec des cohortes saines.

Bien qu'un essai dans un modèle de pathologie permette à l'expérimentateur d'évaluer une sonde en conditions plus réalistes, les importantes variations biochimiques et physiologiques entre les cohortes saines et malades peuvent potentiellement induire des artefacts lors de l'imagerie. Ceci est clairement démontré au Chapitre 5. Il est important de considérer ces variations, avec des contrôles appropriés. Par exemple, Klohs *et al* (2009) testent la sonde MMPsense 680 dans un modèle d'ischémie cérébrale (comparaison entre animaux ayant subi l'opération ou non). Il est évident que la barrière hémato-encéphalique intacte ne permettra fort probablement pas le passage d'une molécule aussi massive. Or, les auteurs négligent de mettre en évidence les différences de captation entre les cohortes. Un autre exemple est l'étude par l'équipe de R. Weissleder dans laquelle le modèle d'athérosclérose murin permet de noter un signal important au niveau de l'aorte atteinte (Deguchi *et al.*, 2006). Les auteurs n'incluent pas de contrôle de distribution non spécifique. Dans les deux cas, un contrôle similaire à QEPR-1.8 aurait pu être utilisé – c'est-à-dire une sonde toujours active et dont on peut suivre la cinétique – afin de démontrer la proportion de signal due à l'activation de la sonde. Dans le cas de nos sondes fluorescentes, il n'aurait pas été correct d'utiliser QEPR-1.8 puisque sa nature est différente de celle de nos composés. Plutôt, la molécule *V* nous a permis de démontrer que la différence entre les tumeurs observées avec la sonde *I* était non spécifique.

6.2 Optimisation du design et l'évaluation de nouvelles sondes spécifiques à la MMP-2 in vivo

Afin de mettre en perspective les concepts clés qui seront discutés dans cette section, les principaux éléments participant à la génération du signal lors de l'utilisation d'une molécule sonde pour l'imagerie sont illustrés à la Fig. 47.

Figure 47. Schéma de génération du contraste entre un tissu d'intérêt et une région de référence



L'apparition de signal dans un TOI est la résultante de l'accumulation et de l'activation de la sonde à l'intérieur de celui-ci. L'inflammation ou l'effet EPR associé à une pathologie (s'il y a lieu) entraîne une augmentation de l'accumulation, affectant aussi le signal détecté. Il est aussi possible que l'activation de la molécule sonde survienne à l'extérieur du TOI, et que celle-ci se retrouve dans le TOI par redistribution.

La différence de signal entre le TOI et la RR est le contraste. Tel qu'expliqué dans le Chapitre 2, il est possible de normaliser le signal pour l'accumulation (contrôle de captation), ce qui permet de fixer $\chi_P = 1$ (où χ_P est le contraste dû à la distribution). Le contraste restant est alors complètement dû à une différence d'activation entre le TOI et la RR – et nous pouvons alors apprécier la qualité du contraste.

Dans le cas de l'induction d'un changement de pharmacocinétique par l'activation (p. ex. sonde CdS avec CPP), une influence de l'activation sur l'accumulation apparait. Il devient alors impossible de ne corriger que pour une différence de captation à moins d'avoir une RR parfaite ($A_{RR} = 0$).

6.2.1 Utilisation d'animaux MMP-2^{-/-} (KO)

Lors de nos tests avec nos sondes fluorescentes, nous avons détecté l'activation de la sonde partout à la surface de l'animal. Ceci peut refléter la réalité puisque la MMP-2 est exprimée par les cellules de la peau – et la constante régénération de ce tissu justifierait son activation. Ceci nous indique aussi que même en retirant la peau, tous les organes capables d'activer la sonde produiraient un bruit de fond important dans le cadre de la détection de la MMP-2 dans le tissu d'intérêt. La Fig. 47 décrit ce phénomène de transfert par « Redistribution ».

Il serait possible d'imaginer un second scénario dans lequel l'activation de la sonde se produirait principalement au niveau des tumeurs. La sonde serait par la suite redistribuée dans l'ensemble de l'animal. Toutefois, nos résultats nous indiquent que ce n'est pas le cas. Les courbes de la Fig.42 décrivent un signal similaire au niveau des tumeurs et des régions de référence à tous les temps, nous indiquant que l'hypothèse de l'activation pancorporelle est plus probable. La seule autre possibilité serait que l'équilibre (redistribution) entre les tumeurs et les tissus de référence serait trop rapide pour être détecté – un cas de figure peu probable en considérant les lacunes de drainage des tissus tumoraux.

L'utilisation d'animaux knockouts (KO) permettrait potentiellement d'éliminer le bruit de fond spécifique présent dans un modèle (dans le cas d'une xéno greffe tumorale) ou de confirmer la participation de la cible dans le processus d'activation d'une sonde (Klohs *et al.*, 2009). Dans la Fig. 48, ceci reviendrait à mettre $A_{RR} = A_{TOI} = 0$ (sauf pour un modèle impliquant une xéno greffe). Liés à un contrôle de compétition, un test en animal KO pour la cible permet d'évaluer la spécificité de la sonde dans l'organisme en entier : si des cibles secondaires existent, la compétition les mettra en évidence. De plus, il devient possible de

comparer une sonde test et son contrôle et de déterminer si leur comportement est identique en absence de la cible, ce qui devrait être le cas.

Des animaux MMP-2 KO pourraient éventuellement être utilisés comme test initial pour les nouvelles structures de sonde. Au lieu d'effectuer des essais d'imagerie, de simples tests de stabilité *in vivo* (sanguine) avec ces animaux permettraient de confirmer la spécificité des séquences peptidiques utilisées. Une fois la spécificité confirmée, les mêmes animaux pourraient être utilisés pour une xénogreffe tumorale de cellules MC7-L1 ou de cellules MC7-L1 MMP-2 KO (à développer), ce qui permettrait de confirmer le potentiel de la sonde pour détecter la MMP-2 *in vivo*.

Ce type de modèle permet de vérifier la spécificité de la sonde, mais pas si la sonde sera utilisable dans un contexte plus réaliste – dans lequel la cible peut apparaître non seulement au niveau du TOI, mais aussi de la RR. Même si très spécifique, une sonde peut être inutilisable si le TOI produit une quantité trop faible de la cible comparativement aux tissus avoisinants – dissimulant ainsi le contraste (ou le signal) désiré.

6.2.3 Optimisation de la captation et la rétention de la sonde

En parallèle avec l'activation pan-corporelle, une autre limitation de nos sondes est l'absence de contraste à long terme entre les tissus normaux et les tumeurs. Nos sondes *I*, *II* et *III* sont très petites par rapport à la sonde QEPR-1.8, et ne reste pas plus de quelques heures dans les souris (la fluorescence revient près de son niveau de base 6 h post-injection – données non montrées). De son côté, la sonde QEPR-1.8 demeure très longtemps dans l'organisme – trop longtemps pour faire des suivis serrés (aux 24 h par exemple).

La taille des molécules sonde est extrêmement importante en imagerie – et est très rarement discutée dans la littérature de l'imagerie de MMP. Pourtant, les modèles d'évaluation des sondes (tumeurs, arthrite, athérosclérose, ischémie) ont tous un point en commun : une inflammation, un recrutement de cellules immunitaires et une augmentation de la perméabilité des tissus. Ceci implique que les molécules de taille élevée pourront alors entrer dans ces tissus. Dans la Fig. 48, l'influence de l'inflammation sera intimement lié à la taille de la molécule sonde. Évidemment, le traitement d'une pathologie affecte à la fois

la production de MMPs et l'inflammation – entraînant une réduction du signal plus grande que si seulement la production de MMPs était affectée.

Lors de la synthèse de nos sondes fluorescentes, nous avons choisi de nous restreindre à des molécules de petite taille afin de minimiser l'impact de l'effet EPR sur nos sondes, et leur permettre d'entrer dans tous les tissus. De cette manière, nous tentions de minimiser la convolution de l'accumulation et de l'activation. Il est probable que nos sondes soient activées de manière non spécifique *in vivo*, et que leur petite taille ne leur permette pas de s'accumuler outre mesure dans les tumeurs. D'ailleurs, les différences de signal entre les tumeurs et le dos sont faibles, même sans normalisation (Fig. 41). Les molécules plus volumineuses, comme la MMPsense 680, s'accumuleront davantage au niveau des tumeurs – et la seule manière de différencier entre activation pan-corporelle et spécifique au TOI serait un contrôle de captation, tel qu'effectué par le groupe de Ntziachsitos (Baeten et al., 2009), mais avec une molécule plus appropriée avec une masse moléculaire et des propriétés similaires mais dont la fluorescence est égale à celle de la sonde activable une fois activée. Un indice de l'activation pan corporelle de la sonde MMPsense 680 repose dans la faible différence de signal entre les tissus de référence avec les sondes MMPsense 680 et Angiosense 750.

À noter : Dans notre cas, la normalisation du signal de *I*, *II* et *III* influence principalement le signal de la patte – ce qui signifierait que la différence d'intensité entre la peau du dos et la peau de la patte serait principalement dû à une différence de position (géométrie du système d'illumination), puisque les organes sous-jacents (principalement des muscles et des os) génèrent un signal faible (Fig. 44, regarder le signal au niveau du dos après le soulèvement de la peau, et Fig. 43, où le muscle de la patte (8) a une signal faible).

Toutefois, grâce à l'effet EPR, il serait possible de mieux cibler les tumeurs et de mettre en évidence la présence de MMP-2. Par exemple, en liant une sonde peptidique sur un polymère PAMAM, la captation tumorale est améliorée (Olson *et al.*, 2010). Ceci est toutefois à double tranchant : une sonde trop massive diffusera plus difficilement au centre d'une tumeur solide (Olson *et al.*, 2009). L'utilisation de molécules plus volumineuses permet aussi de ralentir leur élimination, et donc de laisser davantage de temps à l'enzyme

pour l'activer. Dans le cas de nos sondes, la modification de leur structure de base avec un groupement inerte hydrophile (p. ex. un groupe polyéthylène glycol de 10 kDa) pourrait réduire ou même éliminer leur agrégation et faciliter leur caractérisation, et ralentir leur élimination. De plus, cela permettrait de mieux comparer les séquences peptidiques en tant que substrat, éliminant l'implication de l'agrégation dans l'activation des sondes. Finalement, si l'agrégation est éliminée, il devient alors possible d'ajouter un fluorophore contrôle sans crainte d'observer de l'auto-atténuation. Le contrôle de captation reste primordial pour déterminer la fiabilité de notre mesure et cerner les faux-négatifs (absence de la sonde, et présence de la MMP-2).

6.2.3 Utilisation d'inhibiteurs spécifiques comme contrôle négatif

Un des inhibiteurs les plus spécifiques contre la MMP-2 est le SB-3CT, avec une constante d'inhibition (K_i) de 14 nM pour la MMP-2, 600 nM pour la MMP-9, et dans l'ordre du micromolaire pour les MMP-1, -3, -7 et l'ADAM17/TACE. Cette molécule est vendue en tant qu'inhibiteur spécifique des MMP-2 et MMP-9, avec une définition subjective de la spécificité (c.-à-d. qu'un $K_i > 1 \mu\text{M}$ témoigne d'une inhibition non spécifique). Une comparaison des K_i permet d'établir que le ratio MMP-2/MMP-9 est de 43x, alors que le ratio MMP-9/MMP-3 est de 25x, ce qui en fait met en valeur que cet inhibiteur est plus spécifique entre les MMP-2 et MMP-9 qu'entre les MMP-9 et MMP-3. Comme le modèle de cellules MC7-L1 n'exprime pas la MMP-9 à des niveaux détectables (*in vivo*), cet inhibiteur devient très intéressant au niveau de l'évaluation de la spécificité de l'activation de nos sondes au niveau des tumeurs.

Toutefois, à la lumière de la Fig. 48, nous voyons que l'utilisation d'un inhibiteur peut éliminer l'activation pan corporelle et celle au niveau du TOI. Ce test nous permettrait de confirmer la spécificité de l'activation, mais pas sa localisation et l'impact de la redistribution. Afin d'éviter un tel revers, il serait nécessaire de parvenir à induire l'inhibition de manière locale – par exemple par l'application topique d'une crème contenant l'inhibiteur, ou en effectuant une injection intratumorale. Une fois de plus, il est important de noter que la qualité de ce contrôle repose sur la spécificité de l'inhibiteur, et

que cette dernière repose à son tour sur sa pharmacocinétique – impliquant une interdépendance des deux phénomènes.

6.2.4 Les corrélations des résultats d'imagerie et d'immunohistochimie

Dans plusieurs publications, les auteurs effectuent une corrélation entre la présence ou l'activité des MMPs d'intérêt *vs* la présence ou l'activation de leur sonde. Dans la plupart des essais, la corrélation s'avère faible, même si significative (Fujimoto *et al.*, 2008). Tel qu'indiqué dans la Fig. 48, l'inflammation et la production de MMPs sont inter-reliées dans certains cas (Kuzuya *et al.*, 2006), et les deux sont (potentiellement) causées par la pathologie. Ainsi, l'inflammation, la production de MMPs, le développement de la pathologie (ses autres biomarqueurs) et le signal au niveau du TOI sont tous corrélés. La force de la corrélation repose donc sur le lien entre les deux éléments considérés (p. ex. présence de la MMP ciblée *vs* signal de la sonde), mais sera réduite par la présence des autres éléments impliqués (p. ex. inflammation). Il a d'ailleurs été montré qu'une normalisation par rapport à la captation non spécifique améliore cette corrélation (Baeten *et al.*, 2009). Ceci est une preuve supplémentaire de l'importance de considérer les facteurs non spécifiques influençant la présence de sonde dans le tissu.

6.2.5 Comparaison entre MMPs *in vitro* : quantification des sites actifs

Dans le domaine de l'imagerie des MMPs, les auteurs utilisent des quantités d'enzyme par volume, et non une quantité de site actif d'enzyme par volume, afin de comparer les différentes protéases. Ceci est incorrect puisqu'une portion de l'enzyme peut-être inactive. Les différences entre les k_{cat}/K_M peuvent potentiellement être dues en partie à la qualité du lot d'enzyme. Pour cette raison, il est primordial d'évaluer la digestion de la séquence peptidique après titration des sites actifs des protéases à comparer, ce qui avait été fait par Chen *et al.* (2002) pour les séquences peptidiques utilisées dans nos travaux. Il aurait été préférable d'effectuer la même calibration pour l'étude de nos sondes. Toutefois, deux points sont à considérer :

- L'objectif étant de trouver quel était le candidat le plus intéressant, ce n'est pas le k_{cat}/K_M absolu qui était comparé, mais bien le ratio entre le k_{cat}/K_M de la MMP-2 vs les autres MMPs testées (principalement la MMP-9).
- Avec la MMP-2, le ratio des k_{cat}/K_M entre les séquences peptidiques (Chen *et al.* (2002)) et les sondes correspondantes (manuscrit 2) est d'environ 100 pour toutes les sondes. Cela semble confirmer que la fonctionnalisation des séquences peptidiques a eu un effet similaire pour toutes les sondes.

Toutefois, puisque la suite du projet semble nous amener à utiliser des séquences non-publiées, il faudra titrer les enzymes autant que possible quand une comparaison sera effectuée.

Chapitre 7. Conclusion

Les travaux de cette thèse ont porté sur un ensemble de nouvelles molécules pour l'imagerie spécifique de la MMP-2 *in vivo*, un objectif qui n'a toujours pas été atteint, ni par notre groupe, ni par la communauté scientifique.

Nous avons initialement développé une molécule avec un commutateur de solubilité (PCA2-switch) et testé cette molécule dans un modèle de tumeur mammaire murine. Bien que PCA2-switch nous ait permis de différencier entre des tumeurs avec une différence d'activité MMP-2, le faible contraste généré et l'impossibilité de quantifier (en absolu) l'activité enzymatique nous a poussé à tenter de développer des sondes fluorescentes.

Après un développement ardu, nos sondes fluorescentes activables ont été évaluées dans le même modèle animal. Les résultats *in vivo* mitigés indiquent que les séquences utilisées ne sont pas spécifiques. Nos sondes sont activées de manière pan-corporelle, et ne permettent pas de différencier les tumeurs, ni même de générer un contraste intéressant entre les tumeurs et le dos dans plusieurs cas. Le principal apport que ces travaux auront eu est la mise en évidence de l'impact de l'agrégation sur le phénomène d'atténuation (et d'auto-atténuation).

Les résultats obtenus avec les sondes fluorescentes jettent un doute sur les tests effectués avec PCA2-switch. Par exemple, la séquence peptidique brouillée utilisée pour les contrôles de captation non spécifique (PCA2-scrambled et *Is*) semble clivée rapidement *in vivo*. Il est possible que la différence de cinétique entre les tumeurs détectée grâce à la sonde PCA2-switch ne soit causée que par une différence de pharmacocinétique entre les tumeurs telles que sondées par deux molécules de nature différentes (PCA2-switch non activée initialement *vs* PCA2-scrambled rapidement clivée par différentes peptidases).

Toutefois, nos travaux ont permis de mettre en évidence l'importance des contrôles de captation. Le manuscrit portant sur l'effet EPR dans un modèle de radiothérapie est un exemple frappant. Or, peu d'études dans la littérature de l'imagerie des MMPs incluent ces contrôles. Il est donc critique de continuer à fournir des preuves et des exemples de l'importance de ces contrôles, et ce jusqu'à ce qu'ils deviennent non pas une exception, mais une obligation.

La suite du projet avec les sondes fluorescentes nécessitera la poursuite des objectifs suivants :

- 1- Développement de séquences spécifiques plus stables *in vivo* (minimiser le clivage non spécifique).
- 2- Développement de structures minimisant l'agrégation (facilitera la caractérisation et minimisera l'auto-étouffement dans le cas des sondes fluorescentes).
- 3- Intégration d'un contrôle interne pour la captation (avec un fluorophore non étouffé).

L'objectif 1 est déjà en cours, et les résultats obtenus jusqu'ici par Dre Adrianna Radulska sont prometteurs. Toutefois, les essais de spécificité utilisés jusqu'ici (comparaison plasma et MMP-2 *in vitro*) sont limités aux enzymes stables et présentes dans le plasma. La spécificité des séquences contre les enzymes membranaires (p. ex. MMP-14) ne pourra être déterminée qu'*in vivo*, ce qui nécessitera des séances d'imagerie. Par contre, l'évaluation *in vitro* effectuée nous permettra de minimiser le nombre d'animaux requis.

Il sera nécessaire d'améliorer la structure de nos composés afin d'optimiser leurs propriétés biochimiques. L'ajout d'un PEG de taille intermédiaire (p. ex. 1000 Da) pourrait permettre de conserver la petite taille de nos molécules tout en diminuant l'agrégation que pourrait causer le QSY21. L'ajout du PEG augmenterait potentiellement le temps de demi-vie de la molécule. Sa taille pourrait être ajustée afin de trouver le bon compromis entre la vitesse d'activation des nouvelles séquences *in vivo*, la distribution et le temps de rétention de la molécule dans les TOI et les RR. Aussi, le remplacement du QSY21 par un autre groupe atténuateur serait une option intéressante – mais nos essais dans ce sens avec BHQ-3 n'ont pas généré les résultats escomptés (en fait, le BHQ-3 semble causer une agrégation encore plus importante).

En minimisant l'agrégation, l'ajout d'un fluorophore contrôle devient possible. Avec ce contrôle, la captation non spécifique devient une variable « connue ». Toutefois, comme

deux fluorophores différents doivent être utilisés, il sera nécessaire de considérer les différences optiques entre le fluorophore atténué et le fluorophore contrôle. Sans une correction adéquate, le contrôle restera une approximation superficielle. Une correction adéquate nécessiterait une quantification tomographique, qui n'est pas encore disponible présentement sur le QOS et qui n'est disponible que sur très peu d'instruments.

De nombreux obstacles se dressent encore entre l'état actuel de nos sondes fluorescentes et leur translation en clinique. Dans cette thèse, certains de ces obstacles ont été mis en évidence dans le cadre de l'imagerie de la MMP-2. La plupart des concepts discutés ici s'appliquent potentiellement pour l'imagerie d'autres cibles (enzymatique ou non) et ce peu importe la modalité utilisée.

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais cordialement remercier les Prof. Brigitte Guérin Ph.D., Yves Bérubé-Lauzière Ph.D. et Yves St-Pierre Ph.D., pour avoir accepté de corriger cette thèse et d'évaluer l'ensemble de mon travail.

Ensuite, mes remerciements vont à mon superviseur, Martin Lepage Ph.D. – pour bien des choses, dont je ne nommerai ici que les plus importantes. Merci pour ton support et ta compréhension durant mes cinq années de doctorat. Merci pour tes conseils, autant sur la science que sur « l'humain en science ». Merci pour ta disponibilité et ces nombreux échanges d'idées qui ont permis à la thèse sous sa forme actuelle d'exister.

J'aimerais aussi remercier tous les collègues et amis avec lesquels j'ai eu l'opportunité de travailler ou de discuter de mes travaux – sans vous, tous ce travail n'aurait pas été possible. Voici une liste non exclusive et par ordre alphabétique : Adrianna Radulska, Beata Jastrzebska, Elena Ranyuk, Heidi Ligeret, Hélène Therriault, Luc Tremblay, Marc-André Bonin, Marie-Michèle Courmoyer, Mélanie Archambault, Pierre Baillargeon, Riadh Zriba, Rosalie Lemay, Samia Ait-Mohand, Véronique Dumulon-Perreault et Witold Neugebauer.

Merci à Marc Massonneau pour m'avoir offert la chance de travailler en collaboration avec Quidd, ce qui a rendu possible le troisième manuscrit.

Finalement, je remercie ma conjointe, Isabelle Brochu, pour son support indéfectible.

Liste des références

- Aguilera, T. A., E. S. Olson, M. M. Timmers, T. Jiang and R. Y. Tsien (2009). "Systemic in vivo distribution of activatable cell penetrating peptides is superior to that of cell penetrating peptides." Integr Biol (Camb) **1**(5-6): 371-381.
- Alencar, H., M. A. Funovics, J. Figueiredo, H. Sawaya, R. Weissleder and U. Mahmood (2007). "Colonic adenocarcinomas: near-infrared microcatheter imaging of smart probes for early detection--study in mice." Radiology **244**(1): 232-238.
- Amirbekian, S., R. C. Long, Jr., M. A. Consolini, J. Suo, N. J. Willett, S. W. Fielden, D. P. Giddens, W. R. Taylor and J. N. Oshinski (2009). "In vivo assessment of blood flow patterns in abdominal aorta of mice with MRI: implications for AAA localization." Am J Physiol Heart Circ Physiol **297**(4): H1290-1295.
- auf dem Keller, U., C. L. Bellac, Y. Li, Y. Lou, P. F. Lange, R. Ting, C. Harwig, R. Kappelhoff, S. Dedhar, M. J. Adam, T. J. Ruth, F. Benard, D. M. Perrin and C. M. Overall (2010). "Novel Matrix Metalloproteinase Inhibitor [18F]Marimastat-Aryltrifluoroborate as a Probe for In vivo Positron Emission Tomography Imaging in Cancer." Cancer Res **70**(19): 7562-7569.
- Baeten, J., J. Haller, H. Shih and V. Ntziachristos (2009). "In vivo investigation of breast cancer progression by use of an internal control." Neoplasia **11**(3): 220-227.
- Ballard, J. L., V. K. Peeva, C. J. deSilva, J. L. Lynch and N. R. Swanson (2007). "Comparison of Alexa Fluor and CyDye for practical DNA microarray use." Mol Biotechnol **36**(3): 175-183.
- Bauvois, B. (2012). "New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression." Biochim Biophys Acta **1825**(1): 29-36.
- Bazeli, R., M. Coutard, B. D. Duport, E. Lancelot, C. Corot, J. P. Laissy, D. Letourneur, J. B. Michel and J. M. Serfaty (2010). "In vivo evaluation of a new magnetic resonance imaging contrast agent (P947) to target matrix metalloproteinases in expanding experimental abdominal aortic aneurysms." Invest Radiol **45**(10): 662-668.
- Behera, G. B., P. K. Behera and B. K. Mishra (2007). "Cyanine Dyes : Self Aggregation and Behavior in Surfactants - A Review." J Surface Sci Technol **23**(1-2): 1-31.
- Berlier, J. E., A. Rothe, G. Buller, J. Bradford, D. R. Gray, B. J. Filanoski, W. G. Telford, S. Yue, J. Liu, C. Y. Cheung, W. Chang, J. D. Hirsch, J. M. Beechem and R. P. Haugland (2003). "Quantitative comparison of long-wavelength Alexa Fluor dyes to Cy dyes: fluorescence of the dyes and their bioconjugates." J Histochem Cytochem **51**(12): 1699-1712.
- Bjorklund, M. and E. Koivunen (2005). "Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells." Biochim Biophys Acta **1755**(1): 37-69.
- Bremer, C., S. Bredow, U. Mahmood, R. Weissleder and C. H. Tung (2001). "Optical imaging of matrix metalloproteinase-2 activity in tumors: feasibility study in a mouse model." Radiology **221**(2): 523-529.

- Breyholz, H. J., S. Wagner, B. Levkau, O. Schober, M. Schafers and K. Kopka (2007). "A ¹⁸F-radiolabeled analogue of CGS 27023A as a potential agent for assessment of matrix-metalloproteinase activity in vivo." Q J Nucl Med Mol Imaging **51**(1): 24-32.
- Brooks, P. C., S. Stromblad, L. C. Sanders, T. L. von Schalscha, R. T. Aimes, W. G. Stetler-Stevenson, J. P. Quigley and D. A. Cheresh (1996). "Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3." Cell **85**(5): 683-693.
- Bullok, K. and D. Piwnica-Worms (2005). "Synthesis and characterization of a small, membrane-permeant, caspase-activatable far-red fluorescent peptide for imaging apoptosis." J Med Chem **48**(17): 5404-5407.
- Chakraborti, S., M. Mandal, S. Das, A. Mandal and T. Chakraborti (2003). "Regulation of matrix metalloproteinases: an overview." Mol Cell Biochem **253**(1-2): 269-285.
- Chen, E. I., S. J. Kridel, E. W. Howard, W. Li, A. Godzik and J. W. Smith (2002). "A unique substrate recognition profile for matrix metalloproteinase-2." J Biol Chem **277**(6): 4485-4491.
- Chen, J., C. H. Tung, J. R. Allport, S. Chen, R. Weissleder and P. L. Huang (2005). "Near-infrared fluorescent imaging of matrix metalloproteinase activity after myocardial infarction." Circulation **111**(14): 1800-1805.
- Chen, P. and W. C. Parks (2009). "Role of matrix metalloproteinases in epithelial migration." J Cell Biochem **108**(6): 1233-1243.
- Cherry, S. R., J. A. Sorenson and M. E. Phelps, Eds. (2003). Physics in nuclear medicine. Philadelphia, Saunders.
- Clapper, M. L., H. H. Hensley, W. C. Chang, K. Devarajan, M. T. Nguyen and H. S. Cooper (2011). "Detection of colorectal adenomas using a bioactivatable probe specific for matrix metalloproteinase activity." Neoplasia **13**(8): 685-691.
- Clark, I. M., T. E. Swingler, C. L. Sampieri and D. R. Edwards (2008). "The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors." Int J Biochem Cell Biol **40**(6-7): 1362-1378.
- CMMI, S. I. (1996, 28 juillet 2010). "Table of Fluorochromes." Retrieved 20 janvier, 2012, from <http://floweyt.salk.edu/fluo.html>.
- Cohen, F. M., R. Kuwatsuru, D. M. Shames, M. Neuder, J. S. Mann, V. Vexler, W. Rosenau and R. C. Brasch (1994). "Contrast-enhanced magnetic resonance imaging estimation of altered capillary permeability in experimental mammary carcinomas after X-irradiation." Invest Radiol **29**(11): 970-977.
- Coussens, L. M., B. Fingleton and L. M. Matrisian (2002). "Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations." Science **295**(5564): 2387-2392.
- Davidson, M. W. (1998). "Optical Microscopy Primer: Physics of Light and Color." Retrieved 2012/01/08, 2012, from <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/index.html>.
- Debunne, M., C. Portal, B. Delest, E. Brakenhielm, F. Lallemand, J. P. Henry, H. Ligeret, P. Noack, M. Massonneau, A. Romieu, P. Y. Renard, C. Thuillez and V. Richard (2011). "In Vitro and Ex Vivo Evaluation of Smart Infra-Red Fluorescent Caspase-3 Probes for Molecular Imaging of Cardiovascular Apoptosis." Int J Mol Imaging **2011**: 13.

- Deguchi, J. O., M. Aikawa, C. H. Tung, E. Aikawa, D. E. Kim, V. Ntziachristos, R. Weissleder and P. Libby (2006). "Inflammation in atherosclerosis: visualizing matrix metalloproteinase action in macrophages in vivo." *Circulation* **114**(1): 55-62.
- Devarajan, P., J. J. Johnston, S. S. Ginsberg, H. E. Van Wart and N. Berliner (1992). "Structure and expression of neutrophil gelatinase cDNA. Identity with type IV collagenase from HT1080 cells." *J Biol Chem* **267**(35): 25228-25232.
- Diaz, N. and D. Suarez (2007). "Molecular dynamics simulations of matrix metalloproteinase 2: role of the structural metal ions." *Biochemistry* **46**(31): 8943-8952.
- Ebeling, W., N. Hennrich, M. Klockow, H. Metz, H. D. Orth and H. Lang (1974). "Proteinase K from *Tritirachium album* Limber." *Eur J Biochem* **47**(1): 91-97.
- Egeblad, M. and Z. Werb (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." *Nat Rev Cancer* **2**(3): 161-174.
- Epstein, J. C., P. R. Erickson and A. Wynshaw-Boris (2004). *Inborn error of development: the molecular basis of clinical disorders of morphogenesis*. New York, Oxford University Press.
- Esposito, G., A. Faelli, M. Tosco, N. Burlini and V. Capraro (1979). "Extracellular Space Determination in Rat Small Intestine by Using Markers of Different Molecular Weights." *Pflügers Archiv* **382**: 67-71.
- Etoh, T., C. Joffs, A. M. Deschamps, J. Davis, K. Dowdy, J. Hendrick, S. Baicu, R. Mukherjee, M. Manhaini and F. G. Spinale (2001). "Myocardial and interstitial matrix metalloproteinase activity after acute myocardial infarction in pigs." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**(3): H987-994.
- Evans, L., A. S. Williams, A. J. Hayes, S. A. Jones and M. Nowell (2011). "Selective inhibition of PBEF/Visfatin/NAMPT suppresses leukocyte infiltration and cartilage degradation." *Arthritis Rheum* **63**(7): 1866-1877.
- Evanson, J. M., J. J. Jeffrey and S. M. Krane (1967). "Human collagenase: identification and characterization of an enzyme from rheumatoid synovium in culture." *Science* **158**(3800): 499-502.
- Fan, X. and R. Schulz (2012). "Matrix metalloproteinase-2: an emerging biomarker for reperfusion injury following percutaneous coronary intervention." *Heart* **98**(1): 1-2.
- Fang, J., T. Sawa and H. Maeda (2003). "Factors and mechanism of "EPR" effect and the enhanced antitumor effects of macromolecular drugs including SMANCS." *Adv Exp Med Biol* **519**: 29-49.
- Fanjul-Fernandez, M., A. R. Folgueras, S. Cabrera and C. Lopez-Otin (2010). "Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models." *Biochim Biophys Acta* **1803**(1): 3-19.
- Faust, A., B. Waschkau, J. Waldeck, C. Holtke, H. J. Breyholz, S. Wagner, K. Kopka, W. Heindel, M. Schafers and C. Bremer (2008). "Synthesis and evaluation of a novel fluorescent photoprobe for imaging matrix metalloproteinases." *Bioconjug Chem* **19**(5): 1001-1008.
- Faust, A., B. Waschkau, J. Waldeck, C. Holtke, H. J. Breyholz, S. Wagner, K. Kopka, O. Schober, W. Heindel, M. Schafers and C. Bremer (2009). "Synthesis and evaluation of a novel hydroxamate based fluorescent photoprobe for imaging of matrix metalloproteinases." *Bioconjug Chem* **20**(5): 904-912.

- Fei, X., Q.-H. Zheng, G. D. Hutchins, X. Liu, K. L. Stone, K. A. Carlson, B. H. Mock, W. L. Winkle, B. E. Glick-Wilson, K. D. Miller, R. S. Fife, G. W. Sledge, H. B. Sun and R. E. Carr (2002). "Synthesis of MMP inhibitor radiotracers [¹¹C]methyl-CGS 27023A and its analogs, new potential PET breast cancer imaging agents." J. Labelled Compd. Radiopharm. **45**(6): 449-470.
- Fei, X., Q.-H. Zheng, X. Liu, J.-Q. Wang, K. L. Stone, K. D. Miller, G. W. Sledge and G. D. Hutchins (2003). "Synthesis of MMP inhibitor radiotracer [¹¹C]CGS 25966, a new potential pet tumor imaging agent." J. Labelled Compd. Radiopharm. **46**(4): 343-351.
- Fei, X., Q. H. Zheng, X. Liu, B. H. Sun, H. M. Mock, K. L. Stone, K. D. Miller, G. W. Sledge and G. D. Hutchins (2003). "Synthesis of radiolabeled biphenylsulfonamide matrix metalloproteinase inhibitors as new potential PET cancer imaging agents." Bioorg. Med. Chem. Lett. **13**(13): 2217-2222.
- Füreder-Kitzmüller, E., J. Hesse, A. Ebner, H. J. Gruber and G. J. Schütz (2005). "Non-exponential bleaching of single bioconjugated Cy5 molecules." Chem. Phys. Lett. **404**(1-3): 13-18.
- Fujimoto, S., D. Hartung, S. Ohshima, D. S. Edwards, J. Zhou, P. Yalamanchili, M. Azure, A. Fujimoto, S. Isobe, Y. Matsumoto, H. Boersma, N. Wong, J. Yamazaki, N. Narula, A. Petrov and J. Narula (2008). "Molecular imaging of matrix metalloproteinase in atherosclerotic lesions: resolution with dietary modification and statin therapy." J Am Coll Cardiol **52**(23): 1847-1857.
- Furumoto, S., R. Iwata and T. Ido (2002). "Design and synthesis of fluorine-18 labeled matrix metalloproteinase inhibitors for cancer imaging." J. Labelled Compd. Radiopharm. **45**(11): 975-986.
- Furumoto, S., K. Takashima, K. Kubota, T. Ido, R. Iwata and H. Fukuda (2003). "Tumor detection using ¹⁸F-labeled matrix metalloproteinase-2 inhibitor." Nucl Med Biol **30**(2): 119-125.
- Giannelli, G., J. Falk-Marzillier, O. Schiraldi, W. G. Stetler-Stevenson and V. Quaranta (1997). "Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5." Science **277**(5323): 225-228.
- Goldbach-Mansky, R., J. M. Lee, J. M. Hoxworth, D. Smith, 2nd, P. Duray, R. H. Schumacher, Jr., C. H. Yarboro, J. Klippel, D. Kleiner and H. S. El-Gabalawy (2000). "Active synovial matrix metalloproteinase-2 is associated with radiographic erosions in patients with early synovitis." Arthritis Res **2**(2): 145-153.
- Groves, K., S. Kossodo, E. Handy, J. Jensen, A. Blusztajn, G. Cuneo, J. D. Peterson and M. Rajopadhye. (2012). "In Vivo Imaging of Treatment Effects Using a Novel Near Infrared Labeled Agent: MMPSense™ 750 FAST." from http://shop.perkinelmer.co.uk/Content/relatedmaterials/posters/pst_10_2009v01c.pdf.
- Hadler-Olsen, E., B. Fadnes, I. Sylte, L. Uhlin-Hansen and J. O. Winberg (2011). "Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease." FEBS J **278**(1): 28-45.
- Haider, N., D. Hartung, S. Fujimoto, A. Petrov, F. D. Kolodgie, R. Virmani, S. Ohshima, H. Liu, J. Zhou, A. Fujimoto, A. Tahara, L. Hofstra, N. Narula, C. Reutelingsperger and J. Narula (2009). "Dual molecular imaging for targeting metalloproteinase

- activity and apoptosis in atherosclerosis: molecular imaging facilitates understanding of pathogenesis." Journal of Nuclear Cardiology **16**(5): 753-762.
- Heo, S. H., C. H. Cho, H. O. Kim, Y. H. Jo, K. S. Yoon, J. H. Lee, J. C. Park, K. C. Park, T. B. Ahn, K. C. Chung, S. S. Yoon and D. I. Chang (2011). "Plaque rupture is a determinant of vascular events in carotid artery atherosclerotic disease: involvement of matrix metalloproteinases 2 and 9." J Clin Neurol **7**(2): 69-76.
- Hibbs, M. S., K. A. Hasty, J. M. Seyer, A. H. Kang and C. L. Mainardi (1985). "Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase." J Biol Chem **260**(4): 2493-2500.
- Hickson, J. (2009). "In vivo optical imaging: preclinical applications and considerations." Urol Oncol **27**(3): 295-297.
- Hua, H., M. Li, T. Luo, Y. Yin and Y. Jiang (2011). "Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm." Cell Mol Life Sci **68**(23): 3853-3868.
- Huhtala, P., A. Tuuttila, L. T. Chow, J. Lohi, J. Keski-Oja and K. Tryggvason (1991). "Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. Divergent regulation of expression for the 92- and 72-kilodalton enzyme genes in HT-1080 cells." J Biol Chem **266**(25): 16485-16490.
- Hyafil, F., E. Vucic, J. C. Cornily, R. Sharma, V. Amirbekian, F. Blackwell, E. Lancelot, C. Corot, V. Fuster, Z. S. Galis, L. J. Feldman and Z. A. Fayad (2010). "Monitoring of arterial wall remodelling in atherosclerotic rabbits with a magnetic resonance imaging contrast agent binding to matrix metalloproteinases." Eur Heart J.
- Inoue, Y., K. Izawa, S. Kiryu, A. Tojo and K. Ohtomo (2008). "Diet and abdominal autofluorescence detected by in vivo fluorescence imaging of living mice." Mol Imaging **7**(1): 21-27.
- Invitrogen. (2012). "Invitrogen: Fluorescence Spectra Viewer." Retrieved 20 janvier 2012, from <http://probes.invitrogen.com/servlets/spectraviewer>.
- Ishihara, T., M. Takahashi, M. Higaki, Y. Mizushima and T. Mizushima (2010). "Preparation and characterization of a nanoparticulate formulation composed of PEG-PLA and PLA as anti-inflammatory agents." Int J Pharm **385**(1-2): 170-175.
- Jastrzebska, B., R. Lebel, O. J. McIntyre, B. Paquette, W. Neugebauer, E. Escher and M. Lepage (2009). "Monitoring of MMPs activity in vivo, non-invasively, using solubility switchable MRI contrast agent." Adv Exp Med Biol **611**: 453-454.
- Jastrzebska, B., R. Lebel, H. Therriault, J. O. McIntyre, E. Escher, B. Guerin, B. Paquette, W. A. Neugebauer and M. Lepage (2009). "New enzyme-activated solubility-switchable contrast agent for magnetic resonance imaging: from synthesis to in vivo imaging." J Med Chem **52**(6): 1576-1581.
- Jensen, M. M., J. T. Jorgensen, T. Binderup and A. Kjaer (2008). "Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more accurate and reproducible than determined by 18F-FDG-microPET or external caliper." BMC Med Imaging **8**(1): 16.
- Kang, J., O. Kaczmarek, A. Test, J. Liebscher and L. Dähne (2010). "Prevention of H-Aggregates Formation in Cy5 Labeled Macromolecules." Int J Polym Sci **2010**: 1-7.
- Kim, H. L. (2009). "Optical imaging in oncology." Urol Oncol **27**(3): 298-300.
- Klohs, J., N. Baeva, J. Steinbrink, R. Bourayou, C. Boettcher, G. Royl, D. Megow, U. Dirnagl, J. Priller and A. Wunder (2009). "In vivo near-infrared fluorescence

- imaging of matrix metalloproteinase activity after cerebral ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **29**(7): 1284-1292.
- Koivunen, E., W. Arap, H. Valtanen, A. Rainisalo, O. P. Medina, P. Heikkila, C. Kantor, C. G. Gahmberg, T. Salo, Y. T. Kontinen, T. Sorsa, E. Ruoslahti and R. Pasqualini (1999). "Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor." Nat Biotechnol **17**(8): 768-774.
- Kopka, K., H. J. Breyholz, S. Wagner, M. P. Law, B. Riemann, S. Schroer, M. Trub, B. Guilbert, B. Levkau, O. Schober and M. Schafers (2004). "Synthesis and preliminary biological evaluation of new radioiodinated MMP inhibitors for imaging MMP activity in vivo." Nucl Med Biol **31**(2): 257-267.
- Kunugi, S., A. Shimizu, N. Kuwahara, X. Du, M. Takahashi, Y. Terasaki, E. Fujita, A. Mii, S. Nagasaka, T. Akimoto, Y. Masuda and Y. Fukuda (2011). "Inhibition of matrix metalloproteinases reduces ischemia-reperfusion acute kidney injury." Lab Invest **91**(2): 170-180.
- Kuzuya, M., K. Nakamura, T. Sasaki, X. W. Cheng, S. Itohara and A. Iguchi (2006). "Effect of MMP-2 deficiency on atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(5): 1120-1125.
- Kwan, J. A., C. J. Schulze, W. Wang, H. Leon, M. Sariahmetoglu, M. Sung, J. Sawicka, D. E. Sims, G. Sawicki and R. Schulz (2004). "Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro." FASEB J **18**(6): 690-692.
- Lancelot, E., V. Amirbekian, I. Brigger, J. S. Raynaud, S. Ballet, C. David, O. Rousseaux, S. Le Greneur, M. Port, H. R. Lijnen, P. Bruneval, J. B. Michel, T. Ouimet, B. Roques, S. Amirbekian, F. Hyafil, E. Vucic, J. G. Aguinaldo, C. Corot and Z. A. Fayad (2008). "Evaluation of matrix metalloproteinases in atherosclerosis using a novel noninvasive imaging approach." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(3): 425-432.
- Landis, C. S., X. Li, F. W. Telang, J. A. Coderre, P. L. Micca, W. D. Rooney, L. L. Latour, G. Vetek, I. Palyka and C. S. Springer, Jr. (2000). "Determination of the MRI contrast agent concentration time course in vivo following bolus injection: effect of equilibrium transcytolemmal water exchange." Magn Reson Med **44**(4): 563-574.
- Law, B., A. Curino, T. H. Bugge, R. Weissleder and C. H. Tung (2004). "Design, synthesis, and characterization of urokinase plasminogen-activator-sensitive near-infrared reporter." Chem Biol **11**(1): 99-106.
- Lebel, R., B. Jastrzebska, H. Therriault, M. M. Courmoyer, J. O. McIntyre, E. Escher, W. Neugebauer, B. Paquette and M. Lepage (2008). "Novel solubility-switchable MRI agent allows the noninvasive detection of matrix metalloproteinase-2 activity in vivo in a mouse model." Magn Reson Med **60**(5): 1056-1065.
- Lee, S., K. Park, S. Y. Lee, J. H. Ryu, J. W. Park, H. J. Ahn, I. C. Kwon, I. C. Youn, K. Kim and K. Choi (2008). "Dark quenched matrix metalloproteinase fluorogenic probe for imaging osteoarthritis development in vivo." Bioconjug Chem **19**(9): 1743-1747.
- Lepage, M., W. C. Dow, M. Melchior, Y. You, B. Fingleton, C. C. Quarles, C. Pepin, J. C. Gore, L. M. Matrisian and J. O. McIntyre (2007). "Noninvasive detection of matrix metalloproteinase activity in vivo using a novel magnetic resonance imaging contrast agent with a solubility switch." Mol Imaging **6**(6): 393-403.

- Leppert, D., E. Waubant, R. Galaray, N. W. Bunnett and S. L. Hauser (1995). "T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro." J Immunol **154**(9): 4379-4389.
- Li, C., S. Ke, Q. P. Wu, W. Tansey, N. Hunter, L. M. Buchmiller, L. Milas, C. Charnsangavej and S. Wallace (2000). "Tumor irradiation enhances the tumor-specific distribution of poly(L-glutamic acid)-conjugated paclitaxel and its antitumor efficacy." Clin Cancer Res **6**(7): 2829-2834.
- Licha, K. and C. Olbrich (2005). "Optical imaging in drug discovery and diagnostic applications." Adv Drug Deliv Rev **57**(8): 1087-1108.
- Liu, C. H., Z. You, C. M. Liu, Y. R. Kim, M. J. Whalen, B. R. Rosen and P. K. Liu (2009). "Diffusion-weighted magnetic resonance imaging reversal by gene knockdown of matrix metalloproteinase-9 activities in live animal brains." J Neurosci **29**(11): 3508-3517.
- Lodish, H., A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore and J. Darnell (2000). Molecular Cell Biology. New York, W. H. Freeman and Company.
- Lowe, M. P. (2004). "Activated MR Contrast Agents." Curr Pharm Biotechnol **5**: 519-528.
- Lukacova, V., Y. Zhang, M. Mackov, P. Baricic, S. Raha, J. A. Calvo and S. Balaz (2004). "Similarity of binding sites of human matrix metalloproteinases." J Biol Chem **279**(14): 14194-14200.
- Maeda, H., G. Y. Bharate and J. Daruwalla (2009). "Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect." Eur J Pharm Biopharm **71**(3): 409-419.
- Maeda, H., J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura and K. Hori (2000). "Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review." J Controlled Release **65**(1-2): 271-284.
- Mainardi, C. L., M. S. Hibbs, K. A. Hasty and J. M. Seyer (1984). "Purification of a type V collagen degrading metalloproteinase from rabbit alveolar macrophages." Coll Relat Res **4**(6): 479-492.
- Makino, A., S. Kizaka-Kondoh, R. Yamahara, I. Hara, T. Kanzaki, E. Ozeki, M. Hiraoka and S. Kimura (2009). "Near-infrared fluorescence tumor imaging using nanocarrier composed of poly(L-lactic acid)-block-poly(sarcosine) amphiphilic polydepsipeptide." Biomaterials **30**(28): 5156-5160.
- Massova, I., L. P. Kotra, R. Fridman and S. Mobashery (1998). "Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification." FASEB J **12**(12): 1075-1095.
- McIntyre, J. O., B. Fingleton, K. S. Wells, D. W. Piston, C. C. Lynch, S. Gautam and L. M. Matrisian (2004). "Development of a novel fluorogenic proteolytic beacon for in vivo detection and imaging of tumour-associated matrix metalloproteinase-7 activity." Biochem J **377**(Pt 3): 617-628.
- McNaught, A. D. and A. Wilkinson (1997). IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"), Blackwell Scientific Publications. **2012**.
- Medina, O. P., K. Kairemo, H. Valtanen, A. Kangasniemi, S. Kaukinen, I. Ahonen, P. Permi, A. Annala, M. Sneek, J. M. Holopainen, S. L. Karonen, P. K. Kinnunen and E. Koivunen (2005). "Radionuclide imaging of tumor xenografts in mice using a gelatinase-targeting peptide." Anticancer Res **25**(1A): 33-42.
- Monaco, S., V. Sparano, M. Gioia, D. Sbardella, D. Di Pierro, S. Marini and M. Coletta (2006). "Enzymatic processing of collagen IV by MMP-2 (gelatinase A) affects

- neutrophil migration and it is modulated by extracatalytic domains." Protein Sci **15**(12): 2805-2815.
- Montet, X., M. Rajopadhye and R. Weissleder (2006). "An albumin-activated far-red fluorochrome for in vivo imaging." ChemMedChem **1**(1): 66-69.
- Morancho, A., A. Rosell, L. Garcia-Bonilla and J. Montaner (2010). "Metalloproteinase and stroke infarct size: role for anti-inflammatory treatment?" Ann N Y Acad Sci **1207**: 123-133.
- Morgunova, E., A. Tuuttila, U. Bergmann, M. Isupov, Y. Lindqvist, G. Schneider and K. Tryggvason (1999). "Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed." Science **284**(5420): 1667-1670.
- Moriyasu, S., K. Yamamoto, N. Kureyama, K. Okamura, T. Ikeda and A. Yamatodani (2007). "Involvement of histamine released from mast cells in acute radiation dermatitis in mice." J Pharmacol Sci **104**(2): 187-190.
- Mujumdar, R. B., L. A. Ernst, S. R. Mujumdar, C. J. Lewis and A. S. Waggoner (1993). "Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters." Bioconjug Chem **4**(2): 105-111.
- Nguyen, Q. T., E. S. Olson, T. A. Aguilera, T. Jiang, M. Scadeng, L. G. Ellies and R. Y. Tsien (2010). "Surgery with molecular fluorescence imaging using activatable cell-penetrating peptides decreases residual cancer and improves survival." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(9): 4317-4322.
- Nilsson, L., J. Hallen, D. Atar, L. Jonasson and E. Swahn (2012). "Early measurements of plasma matrix metalloproteinase-2 predict infarct size and ventricular dysfunction in ST-elevation myocardial infarction." Heart **98**(1): 31-36.
- Nishimura, D. G. (1996). Principles of Magnetic Resonance Imaging, Dwight G. Nishimura.
- Ohshima, S., A. Petrov, S. Fujimoto, J. Zhou, M. Azure, D. S. Edwards, T. Murohara, N. Narula, S. Tsimikas and J. Narula (2009). "Molecular imaging of matrix metalloproteinase expression in atherosclerotic plaques of mice deficient in apolipoprotein e or low-density-lipoprotein receptor." J Nucl Med **50**(4): 612-617.
- Olson, E. S., T. A. Aguilera, T. Jiang, L. G. Ellies, Q. T. Nguyen, E. H. Wong, L. A. Gross and R. Y. Tsien (2009). "In vivo characterization of activatable cell penetrating peptides for targeting protease activity in cancer." Integr Biol (Camb) **1**(5-6): 382-393.
- Olson, E. S., T. Jiang, T. A. Aguilera, Q. T. Nguyen, L. G. Ellies, M. Scadeng and R. Y. Tsien (2010). "Activatable cell penetrating peptides linked to nanoparticles as dual probes for in vivo fluorescence and MR imaging of proteases." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(9): 4311-4316.
- Oltenfreiter, R., L. Staelens, V. Kersemans, B. Cornelissen, F. Frankenne, J. Foidart, C. Vandewiele and G. Slegers (2006). "Valine-based biphenylsulphonamide matrix metalloproteinase inhibitors as tumor imaging agents." Appl Radiat Isot **64**(6): 677-685.
- Oltenfreiter, R., L. Staelens, S. Labied, V. Kersemans, F. Frankenne, A. Noel, C. Van de Wiele and G. Slegers (2005). "Tryptophane-based biphenylsulfonamide matrix metalloproteinase inhibitors as tumor imaging agents." Cancer Biother Radiopharm **20**(6): 639-647.

- Oltenfreiter, R., L. Staelens, A. Lejeune, F. Dumont, F. Frankenne, J.-M. Foidart and G. Slegers (2004). "New radioiodinated carboxylic and hydroxamic matrix metalloproteinase inhibitor tracers as potential tumor imaging agents." Nuclear Medicine and Biology **31**(4): 459-468.
- Overall, C. M. and O. Kleifeld (2006). "Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy." Nat Rev Cancer **6**(3): 227-239.
- PerkinElmer. (2012). "PerkinElmer official website." Retrieved 2012/01/08, 2012, from <http://www.perkinelmer.com/>.
- Pham, W., Y. Choi, R. Weissleder and C. H. Tung (2004). "Developing a peptide-based near-infrared molecular probe for protease sensing." Bioconjug Chem **15**(6): 1403-1407.
- Ra, H. J. and W. C. Parks (2007). "Control of matrix metalloproteinase catalytic activity." Matrix Biol **26**(8): 587-596.
- Ross, R. (1993). "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s." Nature **362**(6423): 801-809.
- Ryu, J. H., A. Lee, J. H. Na, S. Lee, H. J. Ahn, J. W. Park, C. H. Ahn, B. S. Kim, I. C. Kwon, K. Choi, I. Youn and K. Kim (2011). "Optimization of matrix metalloproteinase fluorogenic probes for osteoarthritis imaging." Amino Acids **41**(5): 1113-1122.
- Sandanaraj, B. S., H. U. Gremlich, R. Kneuer, J. Dawson and S. Wacha (2010). "Fluorescent nanoprobe as a biomarker for increased vascular permeability: implications in diagnosis and treatment of cancer and inflammation." Bioconjug Chem **21**(1): 93-101.
- Sano, K., T. Temma, Y. Kuge, T. Kudo, J. Kamihashi, S. Zhao and H. Saji (2010). "Radioimmunodetection of membrane type-1 matrix metalloproteinase relevant to tumor malignancy with a pre-targeting method." Biol Pharm Bull **33**(9): 1589-1595.
- Schafers, M., B. Riemann, K. Kopka, H. J. Breyholz, S. Wagner, K. P. Schafers, M. P. Law, O. Schober and B. Levkau (2004). "Scintigraphic imaging of matrix metalloproteinase activity in the arterial wall in vivo." Circulation **109**(21): 2554-2559.
- Scherer, R. L., J. O. McIntyre and L. M. Matrisian (2008). "Imaging matrix metalloproteinases in cancer." Cancer Metastasis Rev **27**(4): 679-690.
- Scherer, R. L., M. N. VanSaun, J. O. McIntyre and L. M. Matrisian (2008). "Optical imaging of matrix metalloproteinase-7 activity in vivo using a proteolytic nanobeacon." Mol Imaging **7**(3): 118-131.
- Sheth, R. A., M. Maricevich and U. Mahmood (2010). "In vivo optical molecular imaging of matrix metalloproteinase activity in abdominal aortic aneurysms correlates with treatment effects on growth rate." Atherosclerosis **212**(1): 181-187.
- Shon, S.-M., J.-H. Park, M. Nahrendorf, D. Schellingerhout, J.-Y. Kim, B.-T. Kang, S.-W. Jeong, E.-J. Kim, J. H. Ryu and K. Kim (2011). "Exercise attenuates matrix metalloproteinase activity in preexisting atherosclerotic plaque." Atherosclerosis.
- Sopata, I. and A. M. Danciewicz (1974). "Presence of a gelatin-specific proteinase and its latent form in human leucocytes." Biochim Biophys Acta **370**(2): 510-523.
- Sopata, I. and J. Wize (1979). "A latent gelatin specific proteinase of human leucocytes and its activation." Biochim Biophys Acta **571**(2): 305-312.

- Steffensen, B., U. M. Wallon and C. M. Overall (1995). "Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen." *J Biol Chem* **270**(19): 11555-11566.
- Stoll, G. and M. Bendszus (2006). "Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization." *Stroke* **37**(7): 1923-1932.
- Su, H., F. G. Spinale, L. W. Dobrucki, J. Song, J. Hua, S. Sweterlitsch, D. P. Dione, P. Cavaliere, C. Chow, B. N. Bourke, X. Y. Hu, M. Azure, P. Yalamanchili, R. Liu, E. H. Cheesman, S. Robinson, D. S. Edwards and A. J. Sinusas (2005). "Noninvasive targeted imaging of matrix metalloproteinase activation in a murine model of postinfarction remodeling." *Circulation* **112**(20): 3157-3167.
- Suzuki, H., M. Sato and Y. Umezawa (2008). "Accurate targeting of activated macrophages based on synergistic activation of functional molecules uptake by scavenger receptor and matrix metalloproteinase." *ACS Chem Biol* **3**(8): 471-479.
- Szabo, K., R. Ablin and G. Singh (2004). "Matrix metalloproteinases and the immune response." *Clin. Appl. Immunol. Rev.* **4**(5): 295-319.
- Tavakoli, S., M. Razavian, J. Zhang, L. Nie, R. Marfatia, L. W. Dobrucki, A. J. Sinusas, S. Robinson, D. S. Edwards and M. M. Sadeghi (2011). "Matrix metalloproteinase activation predicts amelioration of remodeling after dietary modification in injured arteries." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**(1): 102-109.
- Tekabe, Y., Q. Li, J. Luma, D. Weisenberger, M. Sedlar, E. Harja, J. Narula and L. L. Johnson (2010). "Noninvasive monitoring the biology of atherosclerotic plaque development with radiolabeled annexin V and matrix metalloproteinase inhibitor in spontaneous atherosclerotic mice." *J Nucl Cardiol* **17**(6): 1073-1081.
- Temma, T., K. Sano, Y. Kuge, J. Kamihashi, N. Takai, Y. Ogawa and H. Saji (2009). "Development of a radiolabeled probe for detecting membrane type-1 matrix metalloproteinase on malignant tumors." *Biol Pharm Bull* **32**(7): 1272-1277.
- Tomayko, M. M. and C. P. Reynolds (1989). "Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice." *Cancer Chemother Pharmacol* **24**(3): 148-154.
- Tremblay, P., M. J. Beaudet, E. Tremblay, N. Rueda, T. Thomas and L. Vallieres (2011). "Matrix metalloproteinase 2 attenuates brain tumour growth, while promoting macrophage recruitment and vascular repair." *J Pathol* **224**(2): 222-233.
- Tung, C. H., S. Bredow, U. Mahmood and R. Weissleder (1999). "Preparation of a cathepsin D sensitive near-infrared fluorescence probe for imaging." *Bioconjug Chem* **10**(5): 892-896.
- Ujula, T., M. Huttunen, P. Luoto, H. Perakyla, I. Simpura, I. Wilson, M. Bergman and A. Roivainen (2010). "Matrix metalloproteinase 9 targeting peptides: syntheses, ⁶⁸Ga-labeling, and preliminary evaluation in a rat melanoma xenograft model." *Bioconjug Chem* **21**(9): 1612-1621.
- Van de Wiele, C. and R. Oltenfreiter (2006). "Imaging probes targeting matrix metalloproteinases." *Cancer Biother Radiopharm* **21**(5): 409-417.
- Van Wart, H. E. and H. Birkedal-Hansen (1990). "The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(14): 5578-5582.

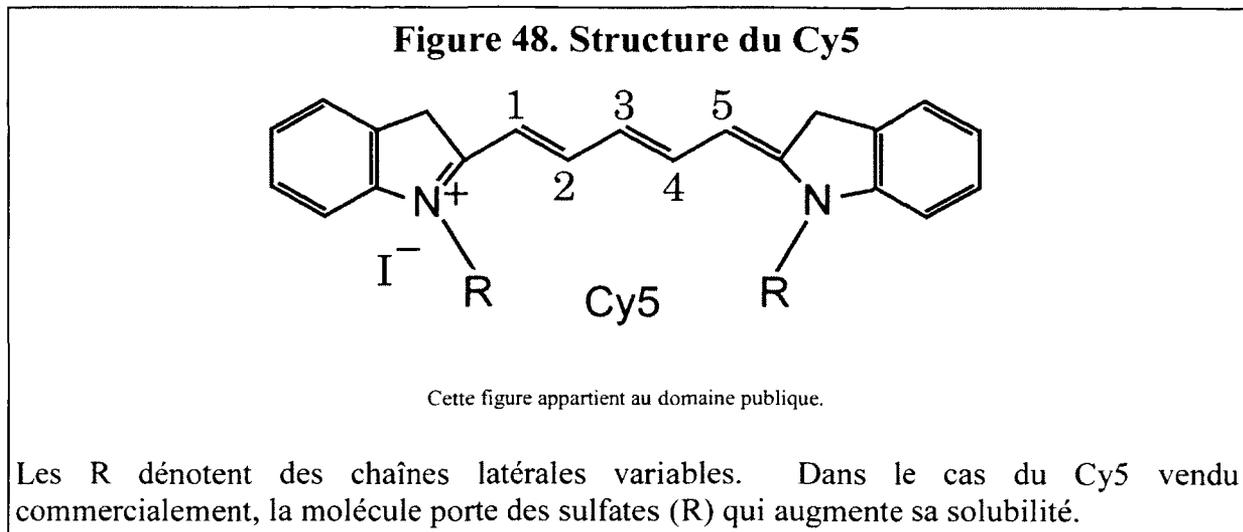
- Vicent, M. J. and R. Duncan (2006). "Polymer conjugates: nanosized medicines for treating cancer." Trends Biotechnol **24**(1): 39-47.
- Wagner, S., H. J. Breyholz, A. Faust, C. Holtke, B. Levkau, O. Schober, M. Schafers and K. Kopka (2006). "Molecular imaging of matrix metalloproteinases in vivo using small molecule inhibitors for SPECT and PET." Curr Med Chem **13**(23): 2819-2838.
- Wagner, S., H. J. Breyholz, M. P. Law, A. Faust, C. Holtke, S. Schroer, G. Haufe, B. Levkau, O. Schober, M. Schafers and K. Kopka (2007). "Novel fluorinated derivatives of the broad-spectrum MMP inhibitors N-hydroxy-2(R)-[[[(4-methoxyphenyl)sulfonyl](benzyl)- and (3-picolyl)-amino]-3-methyl-butanamide as potential tools for the molecular imaging of activated MMPs with PET." J Med Chem **50**(23): 5752-5764.
- Wallis de Vries, B. M., J. L. Hillebrands, G. M. van Dam, R. A. Tio, J. S. de Jong, R. H. Slart and C. J. Zeebregts (2009). "Images in cardiovascular medicine. Multispectral near-infrared fluorescence molecular imaging of matrix metalloproteinases in a human carotid plaque using a matrix-degrading metalloproteinase-sensitive activatable fluorescent probe." Circulation **119**(20): e534-536.
- Wang, L. V. and H. Wu (2007). Biomedical optics: principles and imaging. Hoboken, John Wiley & Sons.
- Wang, W., C. J. Schulze, W. L. Suarez-Pinzon, J. R. Dyck, G. Sawicki and R. Schulz (2002). "Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury." Circulation **106**(12): 1543-1549.
- Wang, W., R. Shao, Q. Wu, S. Ke, J. McMurray, F. F. Lang, Jr., C. Charnsangavej, J. G. Gelovani and C. Li (2009). "Targeting gelatinases with a near-infrared fluorescent cyclic His-Try-Gly-Phe peptide." Mol Imaging Biol **11**(6): 424-433.
- Weissleder, R. and M. J. Pittet (2008). "Imaging in the era of molecular oncology." Nature **452**(7187): 580-589.
- Weissleder, R., B. D. Ross, A. Rehemtulla and S. S. Gambhir (2010). Molecular Imaging: Principles and Practice. Shelton, People's Medical Publishing House.
- Weissleder, R., C. H. Tung, U. Mahmood and A. Bogdanov, Jr. (1999). "In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes." Nat Biotechnol **17**(4): 375-378.
- Wilhelm, S. M., I. E. Collier, B. L. Marmer, A. Z. Eisen, G. A. Grant and G. I. Goldberg (1989). "SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages." J Biol Chem **264**(29): 17213-17221.
- Xue, C. B., M. E. Voss, D. J. Nelson, J. J. Duan, R. J. Cherney, I. C. Jacobson, X. He, J. Roderick, L. Chen, R. L. Corbett, L. Wang, D. T. Meyer, K. Kennedy, W. F. DeGradodagger, K. D. Hardman, C. A. Teleha, B. D. Jaffee, R. Q. Liu, R. A. Copeland, M. B. Covington, D. D. Christ, J. M. Trzaskos, R. C. Newton, R. L. Magolda, R. R. Wexler and C. P. Decicco (2001). "Design, synthesis, and structure-activity relationships of macrocyclic hydroxamic acids that inhibit tumor necrosis factor alpha release in vitro and in vivo." J Med Chem **44**(16): 2636-2660.
- Yan, C. and D. D. Boyd (2007). "Regulation of matrix metalloproteinase gene expression." J Cell Physiol **211**(1): 19-26.

- Yi, D. K., I. C. Sun, J. H. Ryu, H. Koo, C. W. Park, I. C. Youn, K. Choi, I. C. Kwon, K. Kim and C. H. Ahn (2010). "Matrix metalloproteinase sensitive gold nanorod for simultaneous bioimaging and photothermal therapy of cancer." Bioconjug Chem **21**(12): 2173-2177.
- Yoo, B. and M. D. Pagel (2008). "An overview of responsive MRI contrast agents for molecular imaging." Front. Biosci. **13**: 1733-1752.
- Yu, D., P. Peng, S. S. Dharap, Y. Wang, M. Mehlig, P. Chandna, H. Zhao, D. Filpula, K. Yang, V. Borowski, G. Borchard, Z. Zhang and T. Minko (2005). "Antitumor activity of poly(ethylene glycol)-camptothecin conjugate: the inhibition of tumor growth in vivo." J Controlled Release **110**(1): 90-102.
- Zhang, J., L. Nie, M. Razavian, M. Ahmed, L. W. Dobrucki, A. Asadi, D. S. Edwards, M. Azure, A. J. Sinusas and M. M. Sadeghi (2008). "Molecular imaging of activated matrix metalloproteinases in vascular remodeling." Circulation **118**(19): 1953-1960.
- Zhao, T., H. Harada, Y. Teramura, S. Tanaka, S. Itasaka, A. Morinibu, K. Shinomiya, Y. Zhu, H. Hanaoka, H. Iwata, H. Saji and M. Hiraoka (2010). "A novel strategy to tag matrix metalloproteinases-positive cells for in vivo imaging of invasive and metastatic activity of tumor cells." J Controlled Release **144**(1): 109-114.
- Zheng, Q.-H., F. Xiangshu, T. R. DeGrado, W. Ji-Quan, K. L. Stone, T. D. Martinez, D. J. Gay, W. L. Baity, B. H. Mock, B. E. Glick-Wilson, M. L. Sullivan, K. D. Miller, G. W. Sledge and G. D. Hutchins (2003). "Synthesis, biodistribution and micro-PET imaging of a potential cancer biomarker carbon-11 labeled MMP inhibitor (2R)-2-[[4-(6-fluorohex-1-ynyl)phenyl]sulfonylamino]-3-methylbutyric acid [11C]methyl ester." Nucl Med Biol **30**(7): 753-760.
- Zheng, Q. H., X. Fei, X. Liu, J. Q. Wang, H. Bin Sun, B. H. Mock, K. Lee Stone, T. D. Martinez, K. D. Miller, G. W. Sledge and G. D. Hutchins (2002). "Synthesis and preliminary biological evaluation of MMP inhibitor radiotracers [11C]methyl-halo-CGS 27023A analogs, new potential PET breast cancer imaging agents." Nucl Med Biol **29**(7): 761-770.
- Zheng, Q. H., X. Fei, X. Liu, J. Q. Wang, K. L. Stone, T. D. Martinez, D. J. Gay, W. L. Baity, K. D. Miller, G. W. Sledge and G. D. Hutchins (2004). "Comparative studies of potential cancer biomarkers carbon-11 labeled MMP inhibitors (S)-2-(4'-[11C]methoxybiphenyl-4-sulfonylamino)-3-methylbutyric acid and N-hydroxy-(R)-2-[[4'-[11C]methoxyphenyl]sulfonyl]benzylamino]-3-methylbut anamide." Nucl Med Biol **31**(1): 77-85.
- Zheng, Q. H., G. D. Hutchins, B. H. Mock and W. L. J. Winkle (2001). "Fourteenth International Symposium on Radiopharmaceutical Chemistry " J Labelled Compd Radiopharm **44**(Suppl 1): S104-S106.
- Zhou, H., E. J. Bernhard, F. E. Fox and P. C. Billings (1993). "Induction of metalloproteinase activity in human T-lymphocytes." Biochim Biophys Acta **1177**(2): 174-178.
- Zhu, L., H. Wang, L. Wang, Y. Wang, K. Jiang, C. Li, Q. Ma, S. Gao, W. Li, M. Cai, G. Niu, S. Lee, W. Yang, X. Fang and X. Chen (2011). "High-affinity peptide against MT1-MMP for in vivo tumor imaging." J Controlled Release **150**(3): 248-255.

Annexes

Annexe I. Le fluorophore Cy5 : Structure et description

Le Cy5 est un fluorophore dérivé de la famille des cyanines. L'appellation « Cy5 » réfère non pas à une unique molécule, mais à un ensemble de molécules possédant une base structurale commune (Fig. 48).



Les premiers Cy5 sont développés à la fin des années 1980 et modifiés afin de les rendre plus solubles et d'augmenter leur rendement quantique (Mujumdar *et al.*, 1993). Les propriétés de Cy5 dans le PBS (Phosphate buffer saline) telles que publiée par Mujumbar *et al.* (1993) sont les suivantes :

- Longueur d'onde d'excitation/d'émission : 650/667 nm
- Coefficient d'extinction molaire à 650 nm : $250\,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$
- Rendement quantique : 27%

Une autre propriété importante des fluorophore est leur susceptibilité au photoblanchiment lorsqu'ils sont en solution : lors du processus de fluorescence, le fluorophore passe par un état transitoire sensible aux espèces réactives de l'oxygène. Une réaction éventuelle mène à la formation d'une molécule non-fluorescente. Le Cy5 est relativement sensible à ce phénomène lorsque comparé à la fluorescéine qui est utilisée pour des applications similaires (Füreder-Kitzmüller *et al.*, 2005). Le photoblanchiment dépend entre autre de l'intensité de l'excitation, du temps d'exposition et de plusieurs autres conditions.

Une comparaison entre le Cy5 et l'Alexa Fluor 647, deux fluorophores aux propriétés optiques similaires mais de structures différentes, montre que le Cy5 possède une brillance, ou efficacité, (produit du coefficient d'absorption et du rendement quantique) plus élevée mais une résistance moindre au photoblanchiment (Berlier *et al.*, 2003; Ballard *et al.*, 2007). Le Cy5 a aussi tendance à interagir avec lui-même, ce qui modifie ses propriétés optiques. Il est toutefois beaucoup moins dispendieux, ce qui en fait un choix intéressant pour la synthèse de nouvelles sondes.

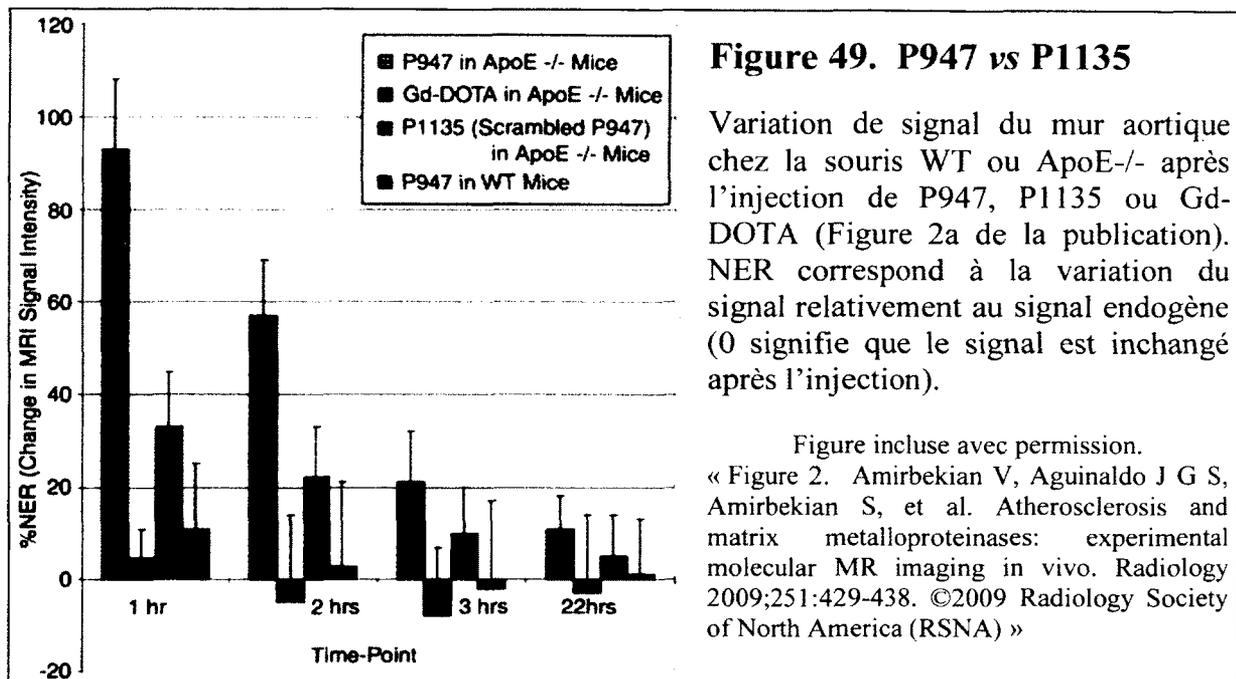
Annexe II. Un regard critique sur l'agent de contraste P947

Cette dissertation sur les résultats obtenus avec l'agent P947 et son contrôle P1135 se base sur la publication suivante :

Atherosclerosis and Matrix Metalloproteinases: Experimental Molecular MR Imaging in Vivo

V. Amirbekian, J.B. Aguinaldo, S. Amirbekian, F. Hyafil, E. Vucic, M. Sirol, D.B. Weinreb, S. Le Greneur, E. Lancelot, C. Corot, E.A. Fisher, Z.S. Galis, Z.A. Fayad.

Radiology (2009); 251(2):429-438



Notez dans cette figure que nous n'avons pas accès à un temps avant 1 heure post injection. En comparant les valeurs brutes, extraites et présentées dans le tableau 5, il est possible d'obtenir le taux d'élimination du signal entre les images. La conclusion est que les taux sont très similaires.

Tableau 5. Signal et taux d'élimination post-injection de P945 et P1135

Temps (h)	P947 - ApoE	P1135 - ApoE	P947 - WT	Temps (h)	P947 - ApoE	P1135 - ApoE	P947 - WT
1	93.4	33.1	10.8	1.5	39%	34%	74%
2	57.1	22	2.8	2.5	38%	36%	45%
3	21.3	10.1	-2.1	9.5	12%	16%	-29%
22	10.5	4.9	1				

Tableau des valeurs brutes extraites de la Fig. 49 et taux d'élimination entre les temps calculés à partir du signal à 1h. P. ex. entre les temps 1h et 2h pour P947 – ApoE (point 1.5h), le taux d'élimination est d'environ $(93.1-57.1)/93.1*100\%$.

L'étude de la cinétique nous permet de dire que la sonde P947 n'a pas d'affinité particulière pour le tissu observé par rapport à P1135 : son élimination n'est pas plus lente, c'est-à-dire que le tissu ne retient pas P947 davantage que P1135. La différence entre les souris WT et ApoE est fort probablement due à l'effet EPR. La différence d'intensité entre P947 et P1135 chez la souris ApoE^{-/-} peut être due à une erreur de dosage ou à un comportement différent entre les sondes (par exemple, l'une d'elle a tendance à précipiter et à rester prise dans la queue de l'animal). Il est aussi à noter que l'IRM a une sensibilité relativement faible. Une concentration de l'ordre du 10^{-4} à 10^{-5} M de molécule sonde est nécessaire pour voir l'effet d'un agent de contraste. Or, il est peu probable que les MMPs, même regroupées, atteignent une telle concentration – ce qui serait nécessaire puisque P945 lie les MMPs 1 pour 1.

Annexe III. Les sondes MMPsense 680 et 750 FAST

Les informations de cette annexe proviennent de documents disponibles sur le site de PerkinElmer (Groves *et al.*, 2012; PerkinElmer, 2012)

Tableau 6. Propriétés des sondes MMPsense

Propriété	MMPsense™ 680	MMPsense™ 750 FAS
Masse moléculaire (Da)	450 000	43 000
Fluorescence ¹		
- Excitation (nm)	680 ± 10	749
- Émission (nm)	700 ± 10	775
Absorbance ¹	680 ± 10 nm	750
Pureté ²	> 95 % ²	> 95% ³
Temps optimal pour l'imagerie (h)	24	6
Temps d'élimination complète (h)	Non disponible	96

1 L'absorbance et la fluorescence ont été déterminés dans le PBS

2 Tel que déterminé par HPLC en mesurant l'absorbance à 680 nm*

3 Tel que déterminé par HPLC en mesurant l'absorbance à 750 nm*

* Noter que l'utilisation de ces longueurs d'onde ne permet pas de voir toutes les impuretés, seulement celles qui ont été fonctionnalisées par le fluorophore.

Figure 50. Spectres d'absorbance et de fluorescence des sondes MMPsense

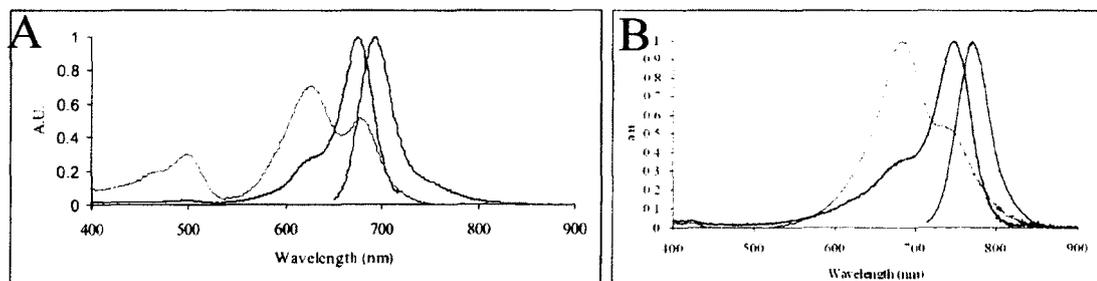
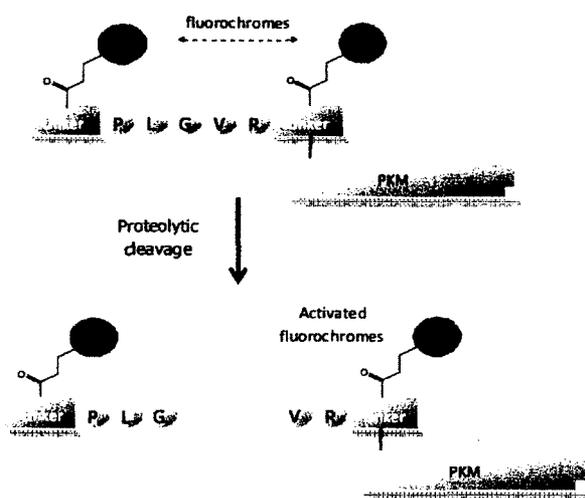


Figure incluse avec permission. « ©2012 PerkinElmer, Inc. All rights reserved. Printed with permission. »

Spectres d'absorbance (gris), d'excitation (bleu) et d'émission (rouge) des sondes MMPsense™ 680 (A) et MMPsense™ 750 FAST (B). Noter la présence d'un pic d'absorbance à une longueur d'onde plus basse – typique de l'agrégation H.

Figure 51. Structure de la sonde MMPsense 750



Structure de la sonde MMPsenseTM 750 FAST et principe d'activation. Le signal de la sonde est augmenté de 25 fois après activation : ceci comprend le signal des deux fragments. In vivo, le petit segment sera éliminé plus rapidement que celui contenant le groupement PKM, dont la nature est protégée par la compagnie, mais qui lui octroient une masse moléculaire importante lui permettant de jouir de l'effet EPR.

Figure incluse avec permission. « ©2012 PerkinElmer, Inc. All rights reserved. Printed with permission. »

Annexe IV. Comparatif MMPSense, ProSense et AngioSense

Cette annexe est basée sur l'article suivant

In Vivo Investigation of Breast Cancer Progression by Use of an Internal Control

John Baeten, Jodi Haller, Helen Shih and Vasilis Ntziachristos

(2009) *Neoplasia* 11(3): 220-227

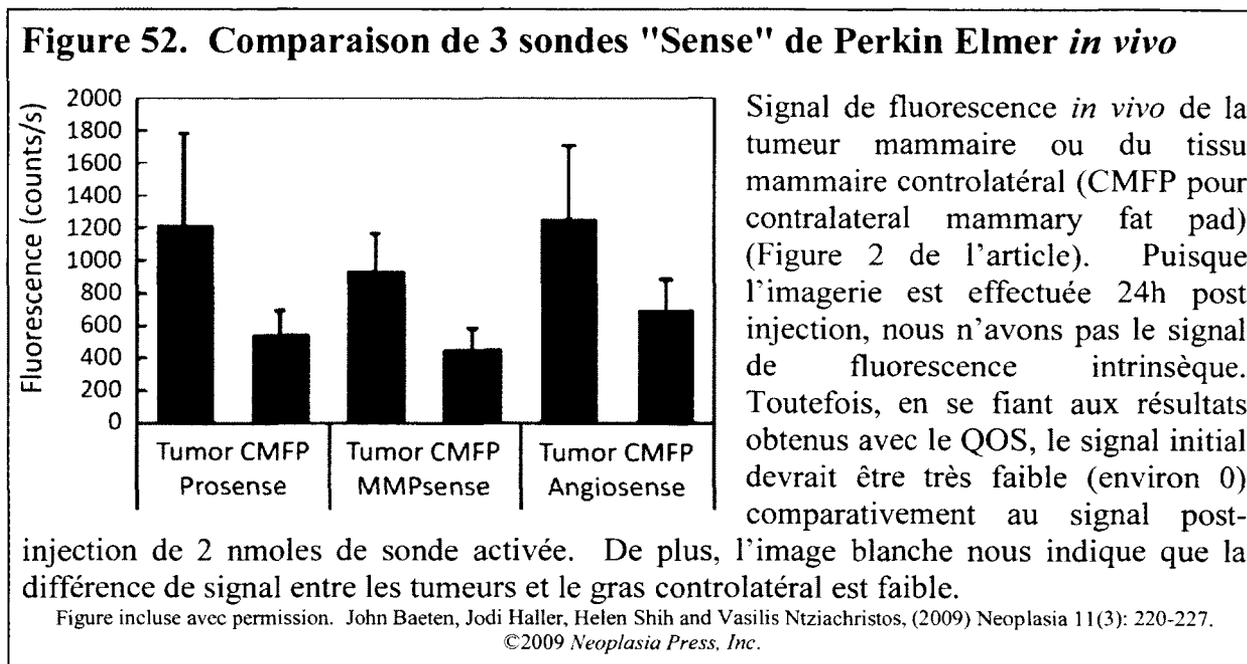


Tableau 7. Signal post-injection de 3 sondes "sense" de Perkin Elmer

Sonde	Tissu	Fluorescence (compte/s)	
		Moyenne	Écart-type
ProSense	Tumor	1221	561
	CMFP	551	138
MMPsense	Tumor	936	230
	CMFP	459	120
AngioSense	Tumor	1258	441
	CMFP	698	193

Il y a une différence notable de captation entre le CMFP et les tumeurs (valeurs AngioSense). En utilisant le ratio AngioSense Tumeur/CMFP, il est possible de corriger les valeurs de ce tableau pour cette différence de captation non spécifique, et ainsi obtenir des valeurs dont la différence est uniquement due à l'activation des sondes.

$$\text{Ratio Tumeur/CMFP} : 1258/698 = 1.80$$

Ainsi, pour comparer les tumeurs et les CMFP, il faut corriger le signal des sondes spécifique observé dans les tumeurs :

Signal Prosense corrigé : $1221 / 1.8 = 677$

Signal MMPsense corrigé : $936 / 1.8 = 519$

Signal Angiosense corrigé : $1258 / 1.8 = 698$ (confirme que la correction fonctionne)

Il devient alors possible de ne comparer que le signal spécifique (Tableau 8).

Tableau 8. Signal spécifique post-injection des 3 sondes "sense" de Perkin Elmer

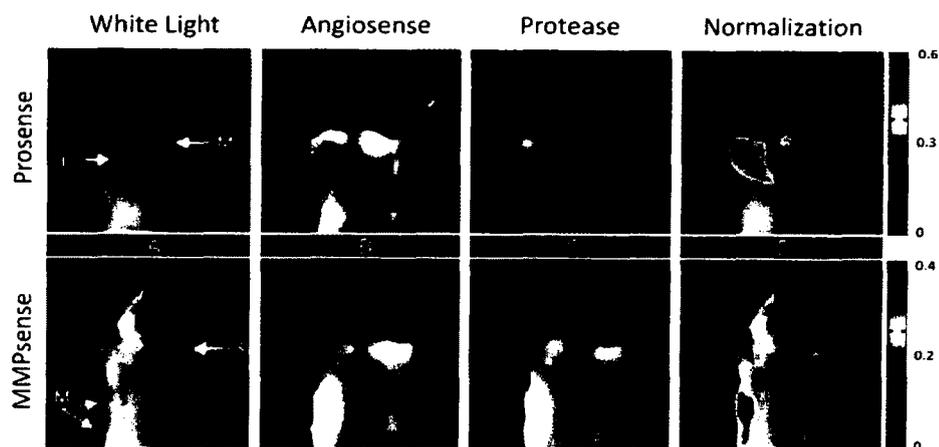
Signal	Tumeur	CMFP	Différence
Signal Prosense corrigé	677	551	23%
Signal MMPsense corrigé	519	459	13%
Signal AngioSense corrigé	698	698	0%

Nous voyons ainsi que la différence de signal qui serait due à une différence d'activation spécifique de la sonde est relativement faible par rapport au signal total. Ceci peut être partiellement expliqué par les arguments suivants :

- Le CMFP contient des MMPs qui activent la sonde, ce qui justifierait la faible différence d'activation entre les tissus.
- Une portion de la sonde est activée dans le sang ou d'autres tissus avant de s'accumuler dans les tumeurs ou les CMFP, ce qui une fois de plus expliquerait la faible différence de signal.
- Le signal endogène (sans fluorophore) et le « bleedthrough » (contamination du signal par la lumière excitatrice) sont élevés, ce qui modifierait le calcul effectué. En se fiant à l'image C de la sonde Prosense (ci-dessous), on voit que les organes dans lesquels il n'y a pas de sonde sont presque noirs (tête, pattes). Toutefois, il n'y

a pas d'échelle d'intensité pour confirmer que les régions noires ont un signal à proximité de 0.

Figure 53. Normalisation du signal des sondes Prosense et MMPsense



Normalisation du signal obtenu avec ProSense 750 et MMPsense™ 680 à l'aide du signal de la sonde Angiosense (Figure 3 de l'article). En comparant les colonnes B et C (Angiosense vs MMPsense), on voit que le signal obtenu avec la sonde spécifique (C) est similaire, ou même plus faible, que le signal obtenu avec la sonde non spécifique (B), ce qui s'explique par le fait que la Angiosense est active à la base. En effectuant la normalisation (les auteurs n'expliquent pas comment ils la font), on obtient la proportion de signal spécifique. À noter, le niveau de transparence a été ajusté afin de dissimuler le signal du côté gauche de la souris (flèche rouge), qui est d'environ 0.2. Comparez ce signal à celui de la petite tumeur (S, flèche blanche), qui monte à environ 0.275, ou à celui de la tumeur moyenne (M, flèches blanches) qui est d'environ 0.30 – 0.35.

John Baeten, Jodi Haller, Helen Shih and Vasilis Ntziachristos, (2009) *Neoplasia* 11(3): 220-227
©2009 Neoplasia Press, Inc.

En effectuant la normalisation, il est possible d'affirmer que le signal spécifique est probablement en dessous de 140% pour la MMPsense 680. Il faut alors se rappeler que le signal de la sonde augmente de 2500% après activation (1250% si on ignore le petit fragment, voir annexe 2). Il est clair aux vues de ces résultats que le signal est loin d'être spécifique à la tumeur. En fait, le signal des sondes spécifiques et de la sonde Angiosense étant similaire, ces résultats semblent indiquer que la sonde est presque complètement activée, peu importe le tissu dans lequel elle se trouve.

Enfin, il faut aussi mentionner que, dans l'article, une corrélation parfaite entre la taille et l'expression des MMPs est observée. Comme aucun suivi dans le temps n'est effectué, il est impossible de déterminer si les grosses tumeurs ont atteint cette taille parce qu'elles avaient plus de MMPs, ou si le fait qu'elles aient atteint cette taille augmente leur production de MMPs (p. ex. pour faciliter l'angiogénèse).

***Annexe V : Évaluation du coefficient de partition des sondes avec
commutateur de solubilité***

Introduction

Les résultats obtenus avec ce protocole varient beaucoup entre les essais, entre autre à cause de la lecture des échantillons à l'ICP-MS. S'assurer que le technicien (à ce jour, Serge Bérubé) effectue des blancs entre chaque échantillon si nécessaire. Contrairement à ce qu'il a été fait pour nos échantillons traités en 2009 et 2010 (digestion 24h à 5% d'acide nitrique), il faut procéder à une digestion plus efficace (solution acide nitrique 100%, 24h, ou se référer au technicien pour une procédure complète). Il a aussi été suggéré d'effectuer un nettoyage des tubulures de l'ICP-MS entre chaque lecture (Prof. Brigitte Guérin, communication personnel).

Préparation des échantillons

1. The compound solution (20 μ L of 2mM of compound diluted in 100% H₂O) is added to 60 μ L of H₂O. (Total volume of aqueous phase : 80 μ L)
2. 80 μ L of pure octanol is added to the same eppendorf (Yields a 50% H₂O, 50% octanol heterogenic solution).
3. Samples are vortexed (2min) and centrifuged (30min) at 900 G for 10 minutes at RT, twice.
4. 20 μ L of the octanol (top) phase are taken and added to 9960 μ L of water/0.5% HNO₃. 20 μ L of water are added to each vial. The final volume is 10 mL (10 000 μ L)
5. The octanol phase is removed from each sample. This step is problematic because a membrane (white) forms at the interface that the pipette tip could not penetrate. Initial attempts to remove the membrane by suction with a 200 μ L pipette failed. The sample is centrifugated, and all octanol fractions are removed using a 200 μ L pipette tip fixed on a vacuum pump (very strong aspiration).
6. 20 μ L of the water (bottom) phase is taken and added to 9960 μ L of water/0.5% HNO₃. 20 μ L of octanol is added to each vial. The final volume is 10 mL (10 000 μ L)
7. Since the octanol does not seem to mix with the water, 1mL of ethanol is added to the solution, yielding a final volume of 11 mL.

All vials contain 9960 μL of a HNO_3 0.5%/ H_2O solution, 20 μL of H_2O , 20 μL of octanol, with their respective compound at roughly 4 μM (from a 2 mM solution diluted 20 / 10 000). The final solution is 0.2% octanol / H_2O

Préparation d'une solution de calibration

1. 50 mL of dilution solution are prepared by adding 19 920 μL (19.92 mL) of HNO_3 0.5%/ H_2O solution, 40 μL of H_2O , 40 μL and 2 mL of ethanol.
2. 34.380 ± 0.001 mg of $\text{GdCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ are weighted ($34.380 \text{ mg} / 371.7 \text{ g/mol} = 92.49 \mu\text{moles}$)
3. This mass is diluted in 924.9 μL of dilution solution (100 mM final concentration).
4. This 100 mM Gd solution is supplied (1.5 mL eppendorf), along with the dilution solution (50 mL Falcon tube).

Annexe VI : Utilisation du lecteur de plaque TECAN m1000

General warning

-Before using the m1000 reader autonomously, one must ask for Dr. Jean-Bernard Denault's permission.

-Each user must make reservation and record the use of the m1000 reader in the reservation book beside the reader. This is mandatory, even for very short readings.

Operating the instrument

-If they are not already turned on, turn the computer on, log in, and then turn the TECAN m1000 on (in this order).

-Wait for the m1000 to complete its start-up (lights flashing, noises)

-Open the "iControl" software, on the desktop. (The m1000 software is the file backup utility).

-All files can be saved under MesDocuments/Labo X/YourNameHere

Preparing the method

Set the heating parameters (under the Instrument menu) (*default is RT (room temperature), but if a previous user set the temperature at another value, your reading will also be at that temperature*). Expect a delay (10 min) before the reader reaches the selected temperature.

Select the appropriate microplate (*selecting the wrong plate can break the reader*)

Select with or without plate cover (*selecting without cover while the cover is on can break the reader*)

Select the wells of interest (reduces acquisition time)

If you need to shake the plate, make sure that the wells contain too little volume to splash inside the reader, which can break the reader.

Select the kind of experiment you want to perform. Absorbance Intensity Scan and Fluorescence Intensity Scan refer to spectrum acquisition. Absorbance Intensity and Fluorescence Intensity refer to a single wavelength emission/excitation. Set the parameters according to your needs. Some iteration might be needed here, so it is handy to have a control well already prepared to test for best gain value (Sensitivity). Keep in mind that values over 40 000 fluorescence are not valid (you are reaching saturation). Expect a 50-200x signal increase of your wells when working with fluorescent activatable probes.

Adding a kinetic condition will allow you to repeat the same Absorbance Intensity or Fluorescence Intensity reading (*but not Absorbance Intensity Scan or Fluorescence Intensity Scan (spectrum acquisition), these cannot be nested inside a kinetic condition*).

When ready to start, you will be prompted to save the method. This method can be reopened later and used as a template for future experiments.

During the acquisition

Excel will open, and the reader will automatically insert data on a new sheet. If you try to use excel at the same time (to save the file, create a graph, copy data, etc), you will be warned that you are disturbing the acquisition of the data and the new data will not be copied. You might also lose or overwrite some data, so be careful.

When you are done, do not forget to remove your plate and close the reader if no one else is registered to use it.

***Annexe VII : Protocole d'évaluation de l'activation des sondes
fluorescentes***

Précautions à prendre

Les sondes sous forme solides sont conservées dans l'obscurité à température pièce ou à -20°C dans un flacon hermétique afin d'éviter une contamination par de l'humidité qui peut rendre les sondes plus difficiles à solubiliser.

Nous conservons les sondes fluorescentes dissoutes dans le DMSO à 4°C. Des concentrations allant jusqu'à 10mM ont été préparées sans problème apparent. Il est préférable de conserver les sondes à l'abri de la lumière.

Une fois diluée dans l'eau, il faut procéder à l'expérience aussi rapidement que possible. Il faut éviter de refroidir la solution ce qui accélère les phénomènes d'agrégation.

Quantification

La quantification des sondes est effectuée grâce à leur absorbance (A). Le coefficient d'extinction à 650 nm a été utilisé pour les sondes à base de Cy5 et de QSY21 ($\epsilon_{650} = 340\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ dans le méthanol). La concentration est calculée à l'aide de :

$$A = \epsilon C L,$$

où L est le trajet optique, en centimètres (1 cm dans le lecteur utilisé).

Brièvement : Le spectrophotomètre est allumé, et le programme correspondant démarré (Spectrophotomètre U-2010 Toshiba, laboratoire de Pierre Lavigne, IPS), et les paramètres sont ajustés pour faire une lecture entre 400 et 800 nm.

Les sondes sont dilués à environ 2 μM dans du méthanol 100%. Il est préférable d'utiliser un volume d'au moins 2 μL de solution mère de sonde, et un volume de 300 μL de méthanol (attention, le premier pipetage du méthanol donne toujours un volume erroné – il faut conditionner la pipette).

Activation des sondes

Ce protocole ne détaille pas l'utilisation du lecteur TECAN. Voir le protocole approprié (Annexe VI).

La sonde est diluée dans un tampon de digestion (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 20 µM ZnCl₂) et conservée à TP à la noirceur.

L'enzyme est diluée à la concentration désirée dans le tampon de digestion et conservée à 4°C.

La sonde est ajoutée à la plaque (96 puits ou 384 puits).

Le lecteur de plaque est ajusté afin de lire les longueurs d'onde appropriées à la sonde (ex. : pour Cy5, 645 nm à l'excitation, 665 nm à l'émission, 5 nm de bande passante).

Le puits contrôle (sans enzyme) est préparé, et le gain de l'appareil (sensibilité) est ajusté afin d'avoir un signal d'environ 200 (ce qui permet d'avoir une augmentation de signal d'environ 200x).

Le puits contrôle est lu durant 5 minutes afin de s'assurer de la stabilité de la lecture (variation de température, etc). La solution d'enzyme est incubée à la température de la réaction durant ce temps).

L'enzyme est ajoutée, et la lecture est démarrée aussitôt que possible.

Analyse

Le puits contrôle est utilisé pour normaliser (diviser) le signal des autres puits.

L'activation de la sonde est comparée au contrôle positif (enzyme = protéinase K). Le contrôle positif ayant tendance à diminuer dans le temps, il faut utiliser le signal contrôle tel que lu immédiatement après activation.

***Annexe VIII : Imagerie optique de sondes fluorescentes avec le
QOS***

Ce protocole est général – et ne se veut pas une liste d'étape précise à suivre. Il est de la responsabilité de l'expérimentateur de connaître ses besoins. Plutôt, ce protocole donne une idée générale de la démarche d'imagerie. Les paramètres entre crochets sont ceux utilisés pour les essais des sondes MAB1190 à MAB2033 *in vivo*. Pour plus de détails sur l'opération du QOS, voir le manuel d'instruction (le manuel disponible au CIMS en date d'aujourd'hui a été préparé par l'auteur de cette thèse).

Préparation

Si nécessaire, les animaux sont rasés et épilés à la crème, et ce 24 heures à l'avance lorsque possible. Il faut faire attention lors de l'emploi d'une crème épilatoire (ex. : Nair) pour ne pas blesser les souris – certaines souris, comme les C57/B6 ne semblent pas tolérer la crème du tout. Il vaut mieux laisser la crème moins longtemps et recommencer si nécessaire.

- Le matériel est préparé (eau tiède, gaze, crème, seringue 1 mL, tapis chauffant).
- L'animal est anesthésié (induction 2% isoflurane, maintient 1.5% anesthésie) et placé sur le tapis chauffant (ou dans sa boîte, sur le tapis chauffant).
- La crème est aspirée dans une seringue (sans aiguille), et étendue sur les régions d'intérêts. Attention, si l'animal a des plaies, vous devez les éviter.
- La crème est laissée 4-5 minutes, puis retirée avec de la gaze sèche.
- De la gaze mouillée est utilisée pour compléter le nettoyage.

Le QOS doit être ouvert un peu à l'avance et il faut s'assurer que le plateau chauffant est en fonction (circulation d'eau chaude). Les filtres appropriés sont sélectionnés. [Filtres Cy5 : excitation 640/14-25 nm, émission 689/23 nm].

Les doses pour l'injection sont préparées à l'avance (dans le cas de nos sondes, une dose de 2 nmoles/20g était utilisée).

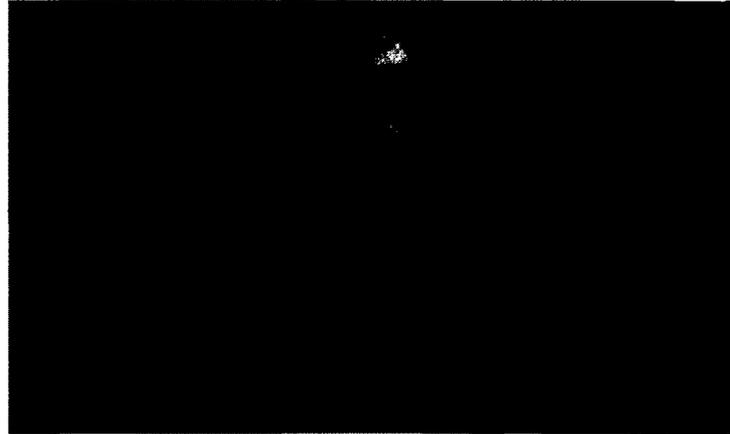
2.4.2 Séance d'imagerie

Les animaux sont anesthésiés [2.5% isoflurane]. Cette valeur est à titre indicatif seulement, et l'anesthésie doit être ajustée au besoin. Attention, le réservoir du QOS se vide rapidement et le système d'anesthésie est problématique (en date de janvier 2012).

Les animaux sont positionnés dans le QOS. Si plusieurs expériences doivent être effectuées avec les mêmes animaux, il est recommandé de mettre 3-4 points de marquage afin de pouvoir repositionner les images (point de repère pour un recalage).

- S'assurer que l'anesthésie est suffisante en surveillant les animaux durant les 5 premières minutes.
- Retirer le filtre d'excitation (mettre les filtres de verre)
- Positionner la caméra à la hauteur nécessaire pour avoir le champ de vue désiré, et mettre une bonnette si nécessaire. [ex.: Z=360mm, Bonnette = aucune]
- Sélectionner la source d'éclairage appropriée [anneau].
- Ajustez l'intensité lumineuse et le temps d'acquisition [0.2 sec, 25%]
- Effectuer le focus au niveau du tissu d'intérêt [1200 μ M]
- Prendre une image en champ clair
- Remettre le filtre d'excitation
- Ajuster l'intensité lumineuse et le temps d'acquisition [20 sec, 100%]
- Prendre une image de bruit de fond de la fluorescence
- Injecter la sonde fluorescente
- Prendre des images de fluorescence à la cadence désirée

Figure 54. Imagerie optique avec le QOS



Exemple du positionnement d'une souris épilée dans le QOS. Les points sur son dos sont positionnés en triangle pour permettre un repositionnement des images dans les expériences subséquentes. Il est primordial de replacer la souris et la caméra exactement au même endroit, car la géométrie des tissus et l'angle de l'éclairage peuvent faire varier le signal observé.

Annexe IX : IRM et évaluation des agents de contraste in vivo

Préparation

- L'animal est anesthésié à l'isoflurane (induction 2%, maintient 1.5%), puis positionné sur un lit adapté à l'insert (« coil ») qui sera utilisé.
- La sonde de respiration (« coussin ») est positionnée sous l'animal au niveau des poumons. L'animal est maintenu sur le lit avec du ruban chirurgical – dans le bas du dos et au niveau des oreilles.
- La sonde de température est attachée au niveau de la queue de l'animal.
- Le tube pour le chauffage est ensuite installé de manière à viser l'animal et la sonde.
- L'insert est positionné dans l'IRM, et les résistances de l'insert sont ajustées (« tuning »).
- L'agent de contraste est préparé (nous injection 3 mg / 20 g dans nos souris Balb/C).

Séance d'imagerie

- Images avant contraste : Les paramètres utilisés pour l'imagerie sont ceux standard pour les acquisitions de type FSEMS (image anatomique haute résolution) et GEMS (contraste T_1 avec différents angles de rotation (Flip) pour générer une carte de T_1 .)

FSEMS (FA 30°, TR :2000ms, #Écho :8, TE :12ms, Average 4, #Tranche : 10, Épaisseur : 1.5mm, Champs de vue : 30x30mm², Résolution matrice : 256x256)

GEMS (FA 10°/20°/25°/35°/50°), TR :100ms, TE :2.9ms, Average 4, #Tranche : 10, Épaisseur : 1.5mm, Champs de vue : 30x30mm²)

- Images durant l'injection : Conserver les paramètres de la séquence GEMS, mais avec un angle de 30°, et répéter cette acquisition sur le temps désiré (« TR array »).

2.5.3 Analyse des images

Les images sont ouvertes dans matlab à l'aide de la fonction « viewer » et analysées de manière standard (voir l'annexe « Opération de la fonction viewer.m pour l'obtention de cartes de concentration) :

- Calcul de la carte de T_1 à l'aide des cartes GEMS à différents angles.
- Calcul de la concentration C à partir du signal S et de la carte de T_1 .
- Tracé d'une région d'intérêt sur l'une des tranches centrales de chaque tumeur.
- Extraction des valeurs de la région d'intérêt et traitements de ces données.

N.B. : Pour effectuer cette analyse plus rapidement, vous pouvez maintenant utiliser la fonction NWMIA pour ouvrir les données, calculer les cartes et effectuer l'analyse des régions d'intérêt. Voir l'annexe correspondante pour l'utilisation du NWMIA.

Annexe X : Analyse des images des sondes fluorescentes in vivo

1) Extraction des données à partir des images .Tif.

L'extraction est effectuée avec la routine (interface) *nwmia.m*

- 1.1 Les images sont ouvertes (*File → LoadAndSortQos*) et renommées en fonction de leur nature (*File → Rename data*)
- 1.2 L'image initiale (fluorescence pré-injection) est soustraite (*2-4D → Remove background image*)
- 1.3 Des ROIs (TG, TD, D, P) sont tracées manuellement sur les tumeurs en utilisant les images en champ clair. (*New ROI (option "polygone")*)
- 1.4 Les ROIs sont copiées (*Copy ROI, ajout du préfixe "c"*) sur l'image en fluorescence correspondantes. Les ROIs initiales sont effacées (*DeleteROI*).
- 1.5 Les statistiques des ROIs sont extraites (*ROI Stats → All ROI in all slices → Chunk (Time) → individual*).
- 1.6 Les données sont extraites vers un fichier texte (*ID data → Export X Data and Y Data*).
- 1.7 L'analyse est sauvegardée (*File → Save NWMIA*).

2) Préparation des données pour l'analyse

Les images obtenues sur le QOS n'étant pas facilement captées à des temps précis, il est parfois nécessaire d'interpoler des images aux temps désirés. Les données sont traitées dans Matlab et la fonction *interp1* de cet environnement est utilisée.

- 2.1 Stocker les valeurs d'intensité dans une matrice *data*.
- 2.2 Extraire le vecteur temps *t* en utilisant la fonction suivante :

```
t = NW_GetQOSImageTimeFromName_[HH MM SS];
```

Le vecteur *t* comprend les temps (post-injection) réels calculés à partir de l'heure *HH*, de la minute *MM* et de la seconde *SS* de l'injection.

- 2.3 Créer un vecteur temps T correspondant aux temps d'intérêt.
- 2.4 Utiliser $DATA = \text{interp}(t, \text{data}, T)$; dans Matlab pour obtenir les données aux temps décrits par T .
- 2.5 Pour interpoler des images complètes, il suffit de placer la fonction d'interpolation dans une boucle, comme ceci :

```

m = size(data,1); n=size(data,2); % data contient les images (m*n*1*temps)
M=zeros(m,n,1,size(T)); % Préallocation de la matrice M
for i=1:m
for j=1:n
M(i,j,1,:) = interp squeeze(data(i,j,1,:), t, T);
end
end
end

```

Où m et n sont la taille des dimensions 1 et 2 des images stockées dans m , et M est la matrice contenant les images interpolées.

3) Normalisation pour les variations de dose injectée

La dose effective injectée dans l'animal varie entre les séances d'imagerie. Par dose effective, nous référons à la concentration du produit non dégradé parvenant dans la circulation de l'animal. Si la canule se bloque, ou si le produit se dégrade avant l'injection, la dose effective en est diminuée. Afin de compenser, le signal de chaque sonde obtenu dans chaque animal est corrigé pour la dose effective en utilisant la patte et le dos comme références. En utilisant deux régions de référence, cela minimise l'impact d'une sélection erronée et réduit le bruit potentiel. De plus, comme les tumeurs sont localisées entre le dos et la patte, l'utilisation de régions de chaque côté permet de réduire les biais dus à la localisation des régions de référence.

$$I_N(t) = \frac{I(t)}{I_D(t) + I_P(t)} (\bar{I}_D(t) + \bar{I}_P(t)) \quad [\text{Éq. 6}]$$

Où I et I_N sont l'intensité du tissu d'intérêt et l'intensité normalisée par rapport aux régions de référence. I_D et I_P sont les intensités des régions du dos et de la patte chez l'animal, alors que \bar{I}_D et \bar{I}_P sont les intensités moyennes de population pour ces mêmes tissus. La normalisation est dynamique – c'est-à-dire que chaque valeur d'intensité à un temps t est

corrigée par les intensités de référence à ce même temps (d'où la présence de la dépendance temporelle, (t) , dans l'équation ci-dessus).

La correction avec la peau de la patte et du dos permet de minimiser l'impact des variations de doses inter-animal lors de notre analyse. Il est nécessaire pour se faire d'assumer que dans tous les animaux, ces régions de référence sont irriguées similairement, et que la sonde qui y rentre subit le même traitement/activation. Ce contrôle n'est pas parfait, car s'il y a activation, la vitesse de celle-ci dépend de la dose réelle. De plus, la présence de zones présentant de l'inflammation peut brouiller les pistes. Finalement, les angles d'éclairage font varier cette normalisation.

4) Normalisation pour la perfusion

De plus, les tumeurs ne seront pas nécessairement irriguées de manière égale (perfusion), et leur fenestration peut aussi varier (perméabilité). La multiplication de ces deux phénomènes résulte en la capacité d'extraction, c'est-à-dire la quantité de sonde qu'un tissu peut capter dans le temps (« uptake »).

Il est donc nécessaire de corriger pour la perfusion de la manière suivante :

L'intensité obtenu avec l'injection de la sonde contrôle (V) est corrigée pour la dose effective avec l'équation X, ce qui nous donne $I_{N,V}$. L'équation suivante est utilisée :

$$I_{NP}(t) = \frac{I_N(t)}{I_{N,V}(t)} (\bar{I}_{N,V}(t)) \quad [\text{Éq. 7}]$$

Où $\bar{I}_{N,V}$ est la moyenne de l'intensité de la sonde contrôle dans le tissu d'intérêt. Nous obtenons l'intensité normalisée et corrigée pour la perfusion, soit I_{NP} . Une fois de plus, notez la dépendance temporelle (correction dynamique).

Dans le cas présent, il est possible d'effectuer un contrôle de la perfusion avec le signal de la sonde V . Encore une fois, il s'agit d'un contrôle imparfait, puisque V est de plus peptide taille et ne possède pas le groupement QSY21 des sondes *I*, *II* et *III*. Tel que discuté dans le chapitre 4, QSY21 peut potentiellement influencer le comportement hydrophobe des sondes. Il serait aussi possible d'utiliser le signal des sondes non activables *IIId* et *IIIId* pour

corriger le signal de *II* et de *III* respectivement. La seule limitation étant que ces sondes ont un signal très faible – ce qui engendre un bruit particulièrement élevé lors de la correction. Ces contrôles ne sont pas plus valides que *V*, puisque la molécule change de nature après son activation. Un contrôle interne serait plus à-propos.

**Annexe XI : Utilisation du modèle Diffusion-Perfusion (DPMModel)
sur les nœuds de calcul et comparaison avec le modèle TOFTS :
Obtention des cartes de K^{Trans} et v_e et recréation des cartes de
concentration.**

1. Introduction

1.1 À propos de ce mode d'emploi :

Ce résumé a été préparé par une personne dont les connaissances en informatique sont limitées, si vous y voyez des erreurs, prière de faire des annotations. Les fonctions nécessaires pour l'utilisation de ces fonctions ont été remises au professeur Martin Lepage, et sont aussi disponibles sur Redmine.

1.2 Version de DPModel et sa compilation :

N.B. La version compilée du fichier (DPModel) fournie avec ce résumé a été compilée sur un nœud de calcul roulant sous SUSE 92. Cela signifie que le programme ne roulera pas sous un système d'exploitation (operating system, SO) plus récent (ex. : Ubuntu/Hardy). Au moment de l'écriture de ce résumé (10-11-2008), les nœuds 2 (Empereur) à 5 étaient sous SUSE 92, mais le responsable des nœuds effectuait une conversion vers un SO plus récent. Il peut être nécessaire, éventuellement, de recompiler ce fichier sous un SO plus récent (et de recoder certaines lignes afin de le permettre).

1.3 Concernant les fichiers sources :

Les dernières versions des fichiers du DPModel et les fichiers nécessaires à sa création (via la compilation, DPModel.cpp, DPModel.h, cs.h, libcsparse.a) sont disponible dans le dépôt de REDMINE (<https://servicesweb.cimf.crc.chus.qc.ca:4080/account/login>), mais il faut l'autorisation de l'administrateur du réseau (en ce moment, M. Laurent Hubert) afin d'y accéder. Recherchez le projet DPModel, et se rendre sous l'onglet « Dépôt ».

1.4 Préparation et logiciels nécessaires :

Il faudra avoir le logiciel de transfert de fichier sécurisé SSH, Matlab, et un compte actif sur le réseau (méduse et Calamar). Il faudra peut-être communiquer avec le responsable du réseau pour obtenir le compte. Il est possible d'effectuer les transferts de fichiers directement sur le nœud père (Calamar, sous Ubuntu/Hardy), mais l'exécution et la compilation doivent avoir cours sur un nœud opérant sous SUSE 92.

Afin de compiler le programme, la commande habituelle est :

```
g++ -o FichierCible FichiersSource libsparse.a
p. ex. g++ -o DPModel DPModel.epp libsparse.a
```

1.5 Préparation du fichier exécutable. :

Le fichier DPModel doit ensuite être copié dans le répertoire où est effectuée l'analyse, ou dans un répertoire de redirection. Dans ce 2^e cas, il sera très facile de lancer DPModel depuis n'importe quel répertoire.

Une fois dans un nouveau répertoire, il faut en changer le mode avec la commande suivante :

```
chmod +x DPModel (ceci le rend exécutable)
```

Préparation des entrées (inputs) :

Les fichiers d'entrée sont les suivants (attention aux majuscules):

1. Data.dat (concentration en fonction du temps)
2. ADC.dat (carte de diffusion, en mm^2/s , eau => 0.002)
3. Cp.dat (concentration plasmatique en fonction du temps, une seule colonne)
4. parameters.dat (dimensions de la matrice, nombre d'image (temps), résolution temporelle (EN MINUTES), résolution spatiale en mm).
5. Config.dat (tous les paramètres utilisés durant l'exécution de DPModel. Une description détaillée de ces paramètres est fournie dans le fichier ConfigTemplate.dat disponible sous le dépôt). *Attention, si Cp.dat comprend un nombre de points plus important que le nombre d'images (ex. : 111 points pour 12 images), il faut mettre le paramètre 'FULL_AIF' à 1.*

Afin de faciliter la préparation de ces fichiers, la fonction MatLab « saveDPModel(variable, 'nom_fichier.dat') » permet de faire la transition entre une variable de Matlab et un fichier texte. Il convertit une matrice (m x n) en un fichier comportant n lignes et m colonnes, et convertit une matrice (m x n x 1(chiffre) x t) en un fichier comportant t lignes, et m*n colonnes. Attention, Cp doit être une colonne, pas une ligne. Cette fonction ne sera utile

que si, pour une raison ou une autre, une variable de façon manuelle est créée au lieu de suivre les instructions dans les sections suivantes.

2. Préparation des entrées

2.1 Obtention d'une carte de concentration

But : Obtenir les fichiers $S(t).mat$ (matrice $m \times n \times 1 \times t$, signal en fonction du temps), $T10.mat$ (matrice $m \times n$, $T1$ intrinsèque), $ADC.mat$ (matrice $m \times n$, carte de diffusion en mm^2/s), ainsi que la variable $ParMRIdataCon.mat$, comprenant les paramètres INJ (frame d'injection), TR (temps de répétition), res (résolution spatiale), r (relaxivité du Magnevist), FA (angle de flip) et dt (résolution temporelle, en MINUTES).

Les fonctions suivantes sont nécessaires : viewer et sous-fonctions, getviewer, setviewer (qui s'emparent ou remettent les données dans le Viewer), mxzoom (fonction de cadrage), SiemenADCRegister, MRIdataCon.

- a) Ouvrir la dynamique (GEMS en fonction du temps) dans le viewer, et entrer :

```
S=getviewer(2);
viewerdata = getviewer(1);
TR=str2num(viewerdata.headers(1).repetitionTime);
res = viewerdata.headers(1).pixelSizeRow;
dt=str2num(viewerdata.headers(2).acquisitionTime)/60-
    str2num(viewerdata.headers(1).acquisitionTime)/60;
INJ=1;
r=3.6;
```

- b) Ouvrir les gems (GEMS avec différents angles de flip)
- c) Corriger l'angle de flip (images Siemens seulement, a-Mode→T1, b-Tracer un cercle dans la matière blanche, c-ROI Operations → Flip Angle Correction, sélectionner WM, appliquer la correction).
- d) Entrer les valeurs de Threshold et Offset
- e) Entrer dans la console:

```
viewerdata = getviewer(1);
FA=viewerdata.sampTimes(1)/10*30; % (ici, 30 est l'angle de flip
    des images en fonction du temps)
T10=getviewer(2);
```

```

g=cat(4, T10, S);
[A T R] = mxzoom(g); % (ici, on tracer une large région autour de
    la ROI afin de rendre la routine plus rapide)
T=T(:,:,1,1:5); % (ici, 5 est le nombre d'images GEMS
    . correspondantes/ouvertes)
setviewer(T, 2);

```

- f) Effectuer le fit (2 paramètres, images). Fitting → 2 para. Bouton Image.
g) Entrer :

```

t=getviewer(1);
T10=t.images{6}; % (ici, 6 est l'image correspondant au Fit).

```

2.2 Ouverture des fichiers de l'ADC

Dans le cas des images Siemens, il est possible que les valeurs de B ne soient pas disponibles. L'image la plus intense B=1000, moyenne B=500, et de faible intensité B=0. Une version modifiée du Viewer (ViewerSiemens) est disponible avec ce dossier. Le renommer viewer.m et remplacer le fichier viewer.m standard. Il y aura alors un menu pour remplacer les valeurs de B automatiquement.

- a) Effectuer le fit dans le viewer : a. Mode → ADC. Entrer Threshold et Offset à 0.
Fitting → 2 para. Bouton Image.
- b) Après le fit, entrer :

```

SiemenADCRegister(); % (Images Siemens seulement)
dd=getviewer(2);
d = dd(:,:,1,4); % (ici, 4 est l'image correspondant au fit)
save ADC.mat d; save T10.mat T10; save S(t).mat S; % (vous
avez maintenant ces fichiers sauvegardés)
save ParMRIdataCon.mat INJ TR res r FA dt % (vous
maintenant ces fichiers sauvegardés)

```

Les fichiers ADC.mat, T10.mat, S(t).mat et ParMRIdataCon.mat sont maintenant prêts.

- c) Entrer :

```

MRIdataCon() % (cette fonction est effectuée par étape, et détecte
les variables déjà fournis pour ne pas réexécuter les mêmes étapes.
Les fichiers marqueurs sont S(t)z.mat c(t).mat et data.dat. Il faut
les effacer pour que la fonction refasse les calculs)

```

N.B. : $c(t).mat$ comprend une carte de la concentration en fonction du temps sous la forme d'une matrice ($m \times n \times 1 \times t$) et pourra être utilisée plus tard...

Les fichiers Data.dat, parametres.dat, ADC.dat sont maintenant prêts.

2.3 Pour obtenir une carte de Cp

But : Obtenir Cp.mat et Cp.dat, une matrice $1 \times n$ de la concentration plasmatique.

Effectuer exactement la même procédure mais pour les pixels choisis comme pixels « sanguins ». L'AIF est ainsi obtenue. Diviser la matrice obtenue par l'inverse de l'hématocrite ($Cp = AIF*/(1-Hématocrite)$). L'hématocrite par défaut est 0.5.

Entrer dans la console:

```
load -ascii data.dat ; Cp = mean(data, 2);
```

Maintenant, il faut décider si Cp est utilisée telle quelle (ex.:1point/image), si elle doit être interpolée ($y1=interp1(Cp, 1:12, 1:0.1:num_image)$) ou si la régression de Cp sera effectuée avec un modèle d'Entrée/élimination (utilisez la fonction fitAIF)

Ne pas oublier d'ajuster le paramètre FULL_AIF en conséquence dans le fichier Config.dat (voir ci-bas).

2.4 Préparation du fichier Config.dat

But : Obtenir un fichier Config.dat comprenant les paramètres optimaux pour l'algorithme de recuit simulé.

Il suffit d'entrer les paramètres désirés en vous servant des informations disponibles dans le fichier ConfigTemplate.dat. Prêter une attention particulière à FULL_AIF, DIFFUSIONSCALING et CRITERIA. S'assurer que le fichier parameters.dat est correct, il survient parfois d'étranges évènements (il se fait probablement écraser quelque part dans la démarche.

3. Préparation de l'exécution et exécution

But : Positionnement des fichiers d'entrée et lancement de DPMModel pour l'obtention des fichiers BestK.dat et BestV.dat.

Les fichiers nécessaires suivants devraient être disponibles : Data.dat, Cp.dat, ADC.dat, parameters.dat et Config.dat.

Ces fichiers doivent être mis sur un répertoire de méduse, et il est ensuite nécessaire accéder à ce répertoire via le nœud sur lequel l'utilisateur désire le lancer. Une fois dans le répertoire, s'assurer que DPMModel est en mode exécutable (chmod +x DPMModel). Exécuter le programme de la manière suivante :

```
nohup nice DPMModel&
```

nohup est le fichier ou les lignes renvoyées par le programme iront. Pour le consulter, entrer cat nohup.out. Sans nohup, l'interface reçoit ces lignes à la place, ce qui permet de suivre le programme de manière plus rapide – mais génère une quantité de ligne importante.

nice est un mode d'exécution spécial, permettant à d'autres utilisateurs d'employer le nœud en même temps. S'ils n'exécutent pas leur fonction en mode nice, ils ont alors préséance sur DPMModel.

& permet à l'utilisateur de se déconnecter du nœud sans interrompre l'exécution de DPMModel. Cela permet d'aller sur un autre nœud et de partir un autre calcul dans le même terminal.

Pour savoir si un/des processus sont en cours, utiliser la fonction suivante :

```
ps -aux |grep nom_utilisateur
p. ex.      ps -aux |grep rlebel
```

Pour suivre l'exécution du programme, regarder trois fichiers (avec la commande « cat nom_de_fichier.ext »).

nohup.out (si cette option est utilisée) comprendra les retours d'erreur de DPMModel

SA.dat fournit des informations sur les solutions trouvées et le temps de calcul. Si seules les en-têtes apparaissent après quelques minutes, alors il y a probablement un problème dans les fichiers inputs (il n'arrive pas à trouver une solution initiale, fort probablement). *Essayez de le relancer, le programme a parfois de la difficulté initialement.*

BestK.dat, BestV.dat et BestFits.dat, comprennent les solutions trouvées. BestFits.dat n'est créé qu'à la fin de l'exécution de DPMoel, alors que les deux autres fichiers apparaissent immédiatement à la première solution proposée.

N.B. : Pour reproduire le modèle TOFTS, sans diffusion, il suffit de mettre le paramètre DIFFUSIONSCALLING à 0. Il ne faut pas fournir une carte ADC à 0, car cela empêche le fit. Ceci permet de comparer le modèle diffusion-perfusion avec le modèle Tofts en utilisant l'algorithme de recuit simulé (voir mémoire de Martin Pellerin). Cet algorithme est beaucoup plus puissant que fminsearch de Matlab, ou du moins il semble que ce soit le cas après quelques essais avec des données cliniques obtenues du scanner Siemens.

4. Recréation des cartes de concentration

But : Obtenir la concentration en fonction du temps tel que calculé à partir d'une carte de K^{Trans} et d'une carte de v_e associées à une concentration plasmatique C_p .

Afin de partir des cartes de K_{trans} et de V_e et de recréer des cartes de concentration les fonctions suivantes sont nécessaire : regenererDonnees, genererDonnees.

Les cartes de K^{trans} et v_e sont aussi nécessaires, soit sous la forme de variables Matlab (ktrans.mat et ve.mat, output de la prochaine section) ou de fichiers texte (BestK.dat et BestV.dat, output de DPMoel). Attention, si les premiers sont disponibles, les seconds sont ignorés.

Vous aurez aussi besoin de la variable ParImpTofts.mat comprenant les champs suivants

```
ParImpTofts =
dt: 1.7000 (résolution temporelle, en minutes) ←
iterations: 20000 (nombre d'itérations de fminsearch pour le fit
fminsearch)
ponderation: [0 2 2 2 2 0 0 0 0 0 1 1] (pondération des images lors du
fit fminsearch)
```

```

inj: 1 (frame précédant l'injection, mais vous pouvez le laissez a 1 ←
model: 2 (modele 2 fit ktrans et ve en même temps, contrairement un model
1.)
Solutions: [1x1 struct] (voir plus bas)
resolution: 1 (résolution spatiale en mm) ←
power: 10 (nombre de pas de diffusion entre chaque point de Cp)
Cp: [1x111 double] (la concentration plasmatique interpolée)

```

(pour le fit `fminsearch` seulement)

```

ParImpTofts.Solutions =
Smart: 1 (Si =1, Choix intelligent des valeurs de ve et de ktrans de
départ pour le fit fminsearch)
Fixed: 0 ( Si =1, les valeurs Fixed_v et k sont les valeurs de départ du
fit fminsearch)
Fixed_v: 0.1000 (Valeur de départ de ve, fit fminsearch)
Fixed_k: 0.1000 (Valeur de départ de ktrans, fit fminsearch)
restriction_ve: [0 1] (fourchette de valeurs acceptables, fit fminsearch)
restriction_ktrans: [0 0.6000] (fourchette de valeurs acceptables, fit
fminsearch)
restricted: 1 (Si =1, utilisation des fourchette de valeurs acceptables,
fit fminsearch)

```

Dans le répertoire, les fichiers `Cp.mat`, `ADC.dat` et `ParImpTofts.mat` doivent être présents. Exécuter `regenererDonnees(var)`. Si `var=1`, le modèle utilisera la diffusion lors de la reconstruction. Si `var=0`, alors il n'y a pas de diffusion lors de la reconstruction.

L'output principal de cette fonction est le fichier `Concentration.mat`, qui fournit une matrice `c(m x n x 1 x t)` de la concentration en fonction du temps.

5. Fit de la concentration avec le modèle Tofts via `fminsearch` de Matlab

Pour ce faire, les variables `ParImpTofts.mat` (voir section précédente), `Cp.mat`, `c(t).mat` (concentration en fonction du temps, que vous avez en output durant la première partie de l'analyse) sont nécessaires.

Entrer dans la console:

```
improved_tofts()
```

Les variables ktrans.mat et ve.mat sont obtenues et utilisables comme entrées dans la section précédente.

Présentation des résultats

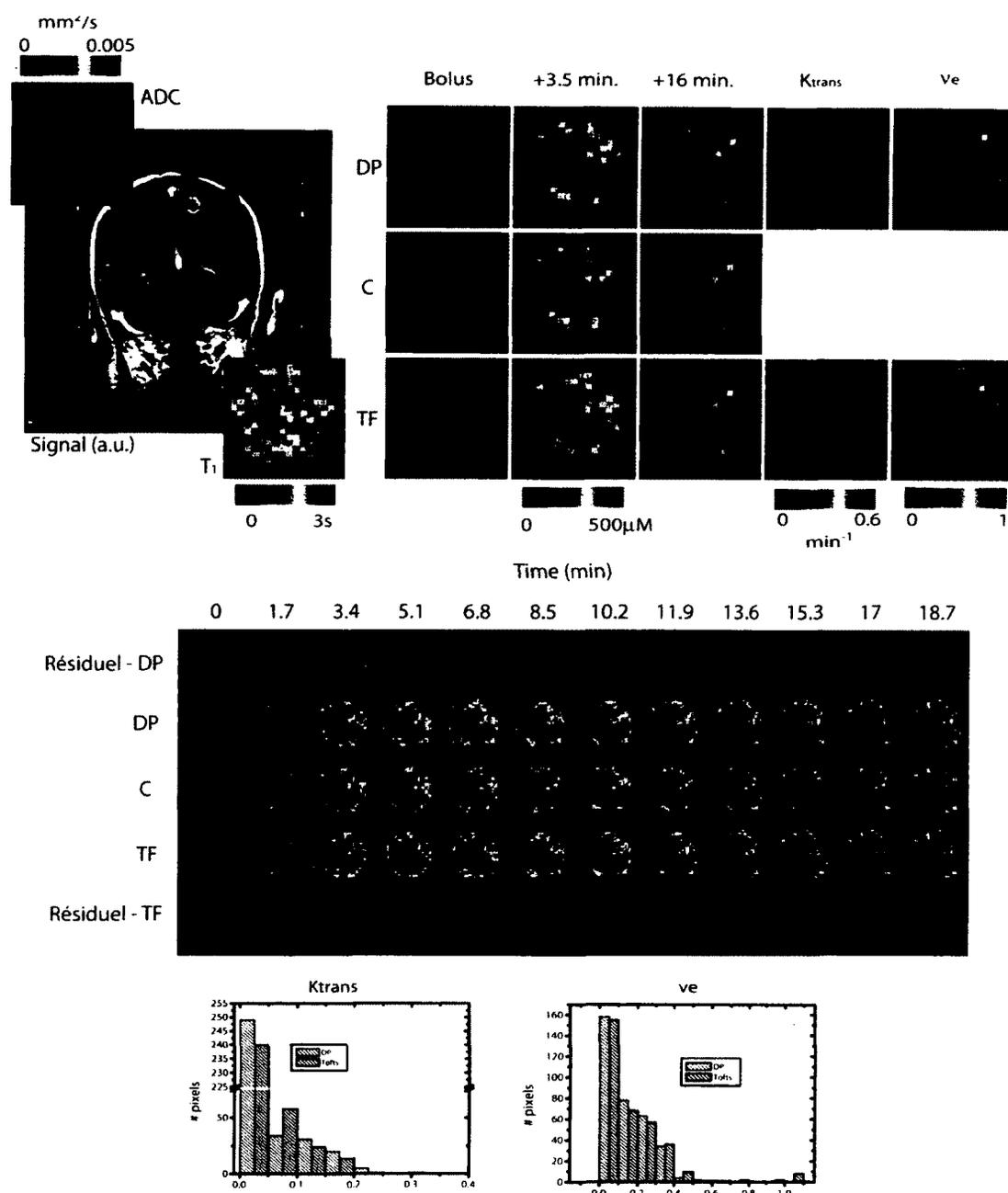
La fonction `montag()` permet de faire une présentation rapide des résultats obtenus.

```
Concentration      =      cat(4,      Concentration_Reelle,
Concentration_DP, Concentration_Tofts);

montag(Concentration, 12, 3, [0 0.5]); %(12 = nombre d'image, 3 =
nombre de fits différents, et le dernier output est simplement les limites de concentration).
```

La page suivante comprend un exemple de fit effectué dans le cadre d'une étude dont l'objectif était d'évaluer l'impact de l'utilisation de la diffusion dans le calcul des cartes de K^{Trans} et de v_e chez l'humain. Les résultats préliminaires ont permis de déterminer qu'il n'y avait pas de différence importante entre les cartes obtenues avec le modèles diffusion-perfusion et celles obtenues avec le modèles classique (Modèle de Tofts, perfusion seulement).

Figure 55. Comparaison des modèles diffusion-perfusion et Tofts pour l'évaluation de K^{Trans} et de v_e



A) Carte de signal (gris) du patient, et cartes de diffusion (ADC) et de T_1 de la tumeur. (B) À partir des modèles diffusion-perfusion (DP) et Tofts (TF), des cartes de K^{Trans} et de v_e sont générées puis la concentration est reconstituée à partir de ces dernières, et comparées à la concentration réelle C. (C) La distribution de K^{Trans} et de v_e est similaire avec les deux modèles.

Annexe XII : Opération de la fonction viewer.m pour l'obtention de cartes de concentration avec le modèle de région de référence

The fit requires T_1 weighted images (GE) with varying flip angle, and as a function of time (DCE-MRI). FSEMS images are an asset, but not necessary. If the fit uses the DP model, the ADC map will also be needed (diffusion coefficients).

1) Open the GE images corresponding to your experiment.

2) Select the regions of interests (ROI). Save these regions with appropriate names based on the slice number. The first ROI to be applied to slice 5 would be named "Slice5_1.mat". Because the name of the file is not explicit, you need to note which ROI corresponds to each file (e.g.: Slice5_1.mat is the wild-type tumour, while Slice5_2.mat is the knocked-down tumour).

3) Select the region of reference (RR), which should be a muscle, and note the slice number on which it applies. The exact name is not important, but it has to be a .mat file. The region of reference is considered to have a known k_{trans} and v_e (0.1 for both). For now, these values are hard-coded into program and must be changed manually if desired.

*One may want to confirm the selection of your ROI and RR by opening the FSEMS images and visualizing your ROI by loading them (with the load button) and reform them to avoid partial volume areas. CAREFUL: if one did not use the same planning (resolution and field of view) for both GEMS and FSEMS, one will need to avoid regions of partial volume manually.

4) In the viewer, in the "File" menu, select "Open Varian DCEMRI file". A panel opens, which requires you to fill in the information you collected up to this point. As options are filled, the following sections of the panel become enabled. Make sure to fill in the sub panels that appear as well.

5) Press the "Fit" button. The function first performs the T_1 maps for the ROI and RR, and then uses the selected model to fit the signal variation of each pixel. The interface may ask you to select how to open the T_1 files during the first loop, just select "Gradient Echo" (on the right). It may also prompt one to enter the threshold and offset. Close the prompt window before setting the values. The offset is the noise in the background (black). The

threshold (use the profile tool instead) is the minimal signal to be considered as non zero and that will be fitted.

6) The output is saved in the repertory you indicated as a “ $m \times n \times 3$ ” matrix where the first dimension is the k_{trans} map, the second dimension is the v_e map, and the third dimension is the sse (square standard error) of the fit. This last value can be considered a score of the validity of the fit. High sse values means the fit did not converge well for these voxels.

